



Nuno Henrique Marçal Farinha **Metodologias alternativas para determinação do teor de esteróis em azeite**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2009

**Nuno Henrique Marçal
Farinha**

**Metodologias alternativas para determinação do teor
de esteróis em azeite**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, realizada sob a orientação científica da Dra. Ivonne Delgadillo, professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família e amigos pelo apoio.

o júri

presidente

Prof. Dr. Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva

professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof^a. Dr. Ivonne Delgadillo Giraldo

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof^a Dr. Ana Isabel Ramos Novo Amorim de Barros

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Trás os-Montes e Alto Douro

agradecimentos

À Professora Doutor Ivonne Delgadillo, orientadora deste trabalho, o meu sincero reconhecimento pelos ensinamentos e incentivos que me transmitiu. Agradeço ainda a disponibilidade dispensada ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente a Flávia e Josi, pela ajuda, companheirismo e amizade.

Agradeço, de uma forma especial, aos meus amigos David, Bruno, Diogo, Djenisa, Humberto, Pedro, Mickael, Ângelo e Tiago pela amizade ao longo destes anos todos na Universidade, foram de uma importância extrema nesta fase da minha vida.

Por fim, expresso a minha profunda gratidão, aos meus pais, irmão e irmã, por toda força, apoio, confiança e amor que me deram ao longo desta etapa da minha vida.

palavras-chave

EFS, saponificação, esteróis, FTIR, IV, azeite, Cromatografia Gasosa, derivatização

resumo

Apesar de o azeite ser um produto de excelência e com grande consumo em toda a Europa, apenas existe uma norma europeia de quantificação de esteróis, sendo essa, desactualizada (1991) e não adaptada às necessidades actuais. Surgindo assim a necessidade de desenvolver novos métodos rápidos e economicamente viáveis. Assim, este trabalho teve como objectivo principal testar uma metodologia alternativa para determinação do teor de esteróis em azeite, simplificando o método processual em relação ao método oficial, bem como a introdução de Infravermelho (IV) para análise de possíveis contaminações.

Foi primeiramente efectuada a saponificação do azeite, no qual foram testados 3 métodos, com uma posterior análise em IV. De seguida foi feita a extracção em fase sólida (EFS), em que foram testados 3 tipos de coluna (sílica, florisil e C18) e 4 métodos de extracção, havendo também nesta etapa análise em IV, não só para verificar em que fracção eram eluídos os esteróis, mas também para verificar possíveis contaminações. Por fim foi feita a derivatização das amostras e consequente análise em Cromatografia Gasosa (CG).

Após testar as metodologias, comprovou-se que para o melhor método utilizado, o azeite utilizado neste trabalho (a circular no mercado), se encontrava dentro dos limites da norma, apresentando uma quantidade de esteróis totais de $1458,3 \pm 0,1$ mg/kg. No caso do óleo de bagaço de azeitona confirmou-se que se tratava de óleo de bagaço de azeitona bruto, com uma quantidade de esteróis totais de $3230,1 \pm 0,1$ mg/kg. No que diz respeito às percentagens de esteróis individuais, os resultados demonstram que todas as amostras estão dentro do limite designado pela norma, apresentando valores para o beta-sitosterol de ≥ 93 %, para o campesterol ≤ 4 % e para o estigmasterol inferior ao de campesterol. Das opções testadas, pode-se destacar como mais adequado o método 3 na parte da saponificação e o método EFS 2 com coluna de sílica da parte da separação dos esteróica, ambos por apresentarem os melhores resultados nessas duas partes, ser reduzido o gasto de solventes, o tempo gasto ser reduzido, ser aplicável a várias amostras, ser de fácil aplicação e operação e por ser economicamente mais viável. O IV revelou-se também como um rápido método detecção de contaminações na amostra. Apesar de não ter sido possível comparar com o método oficial, a metodologia desenvolvida neste trabalho experimental parece ser promissora.

keywords

SPE, saponification, sterols, FTIR, IR, olive oil, GC, derivatization

abstract

Although olive oil is an excellent product with great consumption throughout Europe, there is only a European standard method for the quantification of sterols, which is outdated (1991) and not adapted to the current analytical necessities. So, there is a need to develop new, rapid and economically viable methods. Thus, this work had as main objective to test an alternative methodology for the determination of sterols, simplifying the method in relation to the official method and the introduction of Infrared (IR) for the analysis of possible contaminations.

Firstly, it was carried out the saponification of the olive oil, in which 3 methods were tested, with subsequent analysis via IR. Then, it was made the solid phase extraction (SPE), where were tested 3 types of columns (silica, florisil and C18) and 4 extraction methods. There is also an IR analysis in this stage, not only to verify when were eluted the sterol fraction, but also to check a possible contamination. Finally it was made a derivatization of the samples and the subsequent Gas Chromatography (GC) analysis.

After testing the methodology, it was shown that (for the most effective method), the olive oil in this study (available in market) used was well within the limits of the standard, with an amount of total sterols of $1458,3 \pm 0,1$ mg/Kg. In the case of olive oil pomace was found that was within the limits of the values expected for brute olive oil pomace, with an amount of total sterols of $3230,1 \pm 0,1$ mg/Kg. The results show also the percentages of individual sterols and all samples are within the limit as the standard, with values for beta-sitosterol of $\geq 93\%$, $\leq 4\%$ for campesterol and less than the campesterol for stigmasterol. From the tested options, can be highlighted as the most appropriate method 3 in the saponification part and the method EFS 2 with the silica column in the sterols separation part, because both reduced the used solvent volume, the procedure time, and it can be applied to various samples, easier to use, economically viable and finally because demonstrated good results. The IR, as well proved as a fast method to detecting contamination in the sample. Although it was not possible to compare with the official method, the methodology developed in this experimental work seems to be promising.

Índice

Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas.....	V
Lista de abreviaturas	VI
Parte I - Revisão Bibliográfica	1
1 Azeite	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Composição química do azeite	7
1.2.1 Ácidos gordos	8
1.2.2 Hidrocarbonetos	9
1.2.3 Ceras.....	9
1.2.4 Compostos fenólicos	11
1.2.5 Vitaminas e tocoferóis	11
1.2.6 Esteróis.....	12
1.3 Adulteração/autenticidade do azeite	15
2 Análise instrumental de esteróis	16
2.1 Saponificação	16
2.2 Extracção em fase sólida (SPE).....	17
2.2.1 Introdução	17
2.2.2 Composição das colunas de SPE.....	18
2.2.3 Etapas fundamentais ao SPE	19
2.3 Análise dos espectros de Infravermelho (IV)	21
2.4 Derivatização dos esteróis/Preparação dos trimetilsililéteres (TMSE)	23
2.5 Cromatografia de Gás	24
3 SPE versus TLC	25
4 Objectivos	26
Parte II - Materiais e Metodologia	27
1 Preparação do insaponificável.....	27
1.1 Métodos de saponificação testados	27
1.1.1 Método de preparação do insaponificável 1	28
1.1.2 Método de preparação do insaponificável 2.....	28
1.1.3 Método de preparação do insaponificável 3.....	28
1.2 Separação da fracção esterólica.....	29
1.2.1 Métodos testados	29
1.2.1.1 Método SPE 1 – Sílica ou Florisil.....	30
1.2.1.2 Método SPE 2 - Sílica ou Florisil.....	30
1.2.1.3 Método SPE 3 – Sílica ou Florisil	31
1.2.1.4 Método SPE 4 - Fase reversa C18	31
1.3 Espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-MIR).....	31

1.4 Derivatização/Preparação dos trimetilsililéteres (TMSE)	32
1.5 Cromatografia Gasosa	32
1.5.1 Condições de funcionamento	33
1.5.2 Execução da análise	33
1.5.3 Identificação dos picos	33
1.5.4 Avaliação quantitativa	34
1.5.5 Expressão dos resultados	35
Parte III - Resultados e Discussão	37
1 Análise em IV	37
1.1 Saponificação	38
1.2 SPE	42
2 Análise em GC	49
Parte IV - Conclusão	57
Referências Bibliográficas	59
Anexos	63

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema representativo da classificação do azeite quanto à sua categoria (adaptado Regulamento (CE) N° 702/2007).....	4
Figura 2 - Extracção de azeite pelo sistema de 2 e 3 fases, respectivamente (adaptado de “Olive Oil : Minor Constituents and Health”, 2009).....	7
Figura 3 - Estrutura do esqualeno.....	9
Figura 4 – Exemplo da estrutura de uma cera de éster (adaptado de “The lipid handbook”, 2007)	10
Figura 5 - Representação da estrutura do α -tocoferol (adaptado do livro “ <i>Olive Oil : Minor Constituents and Health</i> ”,2009).....	11
Figura 6 - Representação da fórmula geral dos esteróides (adaptado de “Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology”,2008)	12
Figura 7 - Representação da ciclização do esqualeno a cicloartenol (adaptado de “Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology”, 2008)	13
Figura 8 - Representação da estrutura dos fitosteróis presentes no azeite, com especial relevância para as estruturas (A, B e C) que vão ser quantificadas neste trabalho (adaptado de “The Mevalonate and Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. In <i>Medicinal Natural Product</i> ”, 2001).....	14
Figura 9 - Figura representativa da reacção de saponificação (adaptado do livro <i>Olive Oil : Minor Constituents and Health</i> ,2009)	17
Figura 10 - Representação de uma coluna de extracção em fase sólida (adaptado de “General Chromatography”, 2009)	18
Figura 11 - Representação dos passos fundamentais no processo de SPE (adaptado de “General Chromatography”, 2009)	20
Figura 12 - Esquema representativo da eluição do solvente através da aplicação de pressão com uma seringa ou azoto (adaptado de “General Chromatography”, 2009)...	21
Figura 13 - Figura representativa de um espectro IV na gama entre 600 e 4000 cm^{-1} para os lípidos em geral, onde estão assinalados os principais picos com as correspondentes ligações (reproduzido de “Spectroscopy and spectrometry of lipids”, 2001).....	23
Figura 14 - Estrutura do padrão (5 α -Cholestan-3 β -ol).....	24
Figura 15 – Instrumento inovador adaptado à realização da saponificação, desenvolvido na Universidade de Aveiro (I. Delgadillo - A. Morais).....	27
Figura 15 – Representação de alguns passos do procedimento de saponificação.....	27
Figura 16 – Exemplo dos cartuchos de SPE utilizados	29
Figura 17 – Representação ilustrativa do procedimento de separação dos esteróis	29
Figura 18 - Espectro de infravermelho representativo do padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}	38
Figura 19 - Espectro de infravermelho representativo do azeite, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}	38
Figura 20 - Espectros IV representativos da fracção insaponificável contaminada com triglicerídeos (A) e a fracção insaponificável não contaminada (B), depois da extracção (adaptado de “Some important aspects of sterol analysis of vegetable oils”, 2001).....	39
Figura 21 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções insaponificáveis (método saponificação 1) com azeite e padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}	40

Figura 22 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções insaponificáveis (método saponificação 2) com azeite e padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	40
Figura 23 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções insaponificáveis (método saponificação 3) com azeite e padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	41
Figura 24 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 1; cartucho de SPE de sílica; amostra C1) com o padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	43
Figura 25 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 2; coluna de SPE de sílica; amostra A1) com o padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	44
Figura 26 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 2; coluna de SPE de sílica; amostra A2) com o padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	44
Figura 27 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 2; coluna de SPE de Florisil; amostra H1) com o padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	45
Figura 28 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 2; coluna de SPE de Florisil; amostra H2) com o padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	45
Figura 29 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 3; coluna de SPE de sílica; amostra B2) com o padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	46
Figura 30 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 3; coluna de SPE de sílica; amostra B1) com o padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	47
Figura 31 - Espectros de infravermelho onde está representado a comparação das fracção eluída (método SPE 4; coluna de SPE de fase reversa C18; amostra F1) com o padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	48
Figura 32 - Espectros de infravermelho onde está representado a comparação das fracção eluída (método SPE 4; coluna de SPE de fase reversa C18; amostra F2) com o padrão, entre 550 cm ⁻¹ e 4000 cm ⁻¹	48
Figura 33 - Cromatograma representativo do tempo de retenção do colestanol (Padrão interno, 5 α -Cholestan-3 β -ol) e de outros principais esteróis presentes no azeite.....	49
Figura 34 - Cromatograma representativo da fracção injectada (amostra A1 depois de ser derivatizada).....	50
Figura 35 - Cromatograma representativo da fracção injectada (amostra A2 depois de ser derivatizada).....	51
Figura 36 - Cromatograma representativo amostra B1 depois de ser derivatizada.....	64
Figura 37 - Cromatograma representativo amostra H1 depois de ser derivatizada.....	64
Figura 38 - Cromatograma representativo amostra H2 depois de ser derivatizada.....	65
Figura 39 - Cromatograma representativo amostra B2 depois de ser derivatizada.....	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Representação dos métodos utilizados para a análise química e sensorial do azeite com os valores limite correspondentes apresentados em cada categoria de azeite (adaptado Regulamento (CE) N.º 702/2007).....	5
Tabela 2 - Ácidos gordos existentes no azeite e respectiva proporção (adaptada de “Codex Alimentarius”, 2003).....	8
Tabela 3 - Quantidade de ceras nos diferentes tipos de azeite (adaptado do “Jornal Oficial da União Europeia”, Regulamento (CE) N.º 702/2007).....	10
Tabela 4 - Representação da proporção de esteróis presentes no azeite conforme a sua categoria (reproduzido de “Jornal Oficial da União Europeia, Regulamento”, (CE) N.º 702/2007).....	15
Tabela 5 - Representação das percentagens de recuperação de dois métodos de extracção, TLC e SPE (cartucho 1 g sílica).....	25
Tabela 6 – Métodos extracção e tipo de coluna utilizados para cada amostra de azeite e óleo de bagaço de azeitona	42
Tabela 7 – Comparação do tempo de retenção entre o padrão interno (PI) e os fitosteróis	50
Tabela 8 – Representação das percentagens de fitosteróis presentes na Amostra A1, tanto como a seu tempo de retenção, área de pico, tempo de retenção relativo ao PI e quantidade de esteróis individuais e totais	51
Tabela 9 - Representação da percentagem de fitosteróis presentes na Amostra A2, tanto como a seu tempo de retenção, área de pico, tempo de retenção relativo ao Padrão Interno (PI) e quantidade de esteróis individuais e totais.....	52
Tabela 10 – Valores dos esteróis totais respeitantes as amostras de azeite para o respectivo método de extracção, saponificação e tipo de coluna.	52
Tabela 11 - Valores dos esteróis totais respeitantes as amostras de óleo de bagaço de azeitona para o respectivo método de extracção, saponificação e tipo de coluna.	53
Tabela 12 – Percentagem de fitosteróis para cada amostra (azeite).....	53
Tabela 13 - Percentagem de fitosteróis para cada amostra (óleo de bagaço de azeitona)	54

Lista de abreviaturas

LDL – “Low Density Lipoproteins”

HDL – “High Density Lipoproteins”

DOP - Denominação de Origem Protegida

IGP - Indicação Geográfica Protegida

IV – Infravermelho

IR – “Infrared”

GC – “Gas Chromatography” ou Cromatografia Gasosa

CE – Comunidade Europeia

FTIR – “Fourier Transform InfraRed”

SPE - “Solid Phase Extraction” ou extracção em fase sólida

TMSE - Trimetilsililéteres

TLC – “Thin Layer Chromatography” ou cromatografia de camada fina

PI – Padrão Interno

FID – “Flame Ionization Detector”

min – minutos

ml – mililitros

μl – microlitros

% - percentagem

5α-Cholestan-3β-ol - colestanol

Parte I - Revisão Bibliográfica

1 Azeite

1.1 Introdução

Primeiro que tudo, para ter uma certa noção do objecto em estudo, a sua caracterização é essencial. O azeite, extraído do fruto de oliveira, *Olea europea L.*, é um óleo vegetal que é fabricado directamente a partir de azeitonas e sem extracção por solventes químicos, por esses motivos consegue reter compostos voláteis e outros compostos responsáveis pelas suas características. A sua origem remonta a tempos ancestrais, apareceu pela primeira vez na Ásia Ocidental, mas futuramente se estendeu à zona mediterrânica, onde é predominante hoje em dia para sobrevivência das economias e para a alimentação, nomeadamente para Portugal, Itália, Espanha e Grécia (1). Fazendo uma breve revisão histórica, o azeite representa uma das maiores fontes de gordura nos países mediterrâneos, como já referido, sendo a cultura sobre o consumo deste tipo de alimento muito antiga, isto devido essencialmente às suas propriedades benéficas a nível da saúde, mas especialmente pelo seu sabor e aroma delicioso. Estas propriedades só são conseguidas quando o processamento para obtenção deste fluido é estritamente mecânico/físico. Desde à 6000 anos que o azeite faz parte dos hábitos dos povos que habitam a Bacia do mediterrâneo, sendo originário do Antigo Egipto, porém inicialmente não foi utilizado para esse fim, era sim utilizado para iluminar os palácios e como produto de beleza. Com os Fenícios, foi um dos produtos mais importantes nas suas relações comerciais. Mais tarde com os gregos e romanos, juntamente com o vinho e o trigo, o azeite constituiu a base alimentar do povo, que seria mantida mais tarde pelos bárbaros, na Europa Medieval (1). A sua crescente importância resultou das inúmeras utilizações que lhe eram dadas, sendo empregue na alimentação, na medicina, higiene e beleza. Foi utilizado como combustível, lubrificante para ferramentas e alfaías agrícolas, impermeabilizante para fibras têxteis e serviu como um elemento essencial em rituais religiosos. Até ao Século XIX, foi utilizado nas lamparinas de azeite para garantir a iluminação, até à introdução das lamparinas a gás (1, 2).

Mas hoje em dia um ponto muito importante é o da saúde, e é aí que este óleo tem mais benefícios, visto que garante uma alimentação saudável. Assim, graças a sua composição ser semelhante à da gordura humana, o azeite é bem assimilado e favorece a absorção das vitaminas A, D, K e E (vitaminas lipossolúveis). Também o facto de ser rica em vitamina E lhe confere um forte

poder antioxidante, impedindo a formação de radicais livres de oxigénio e atrasando os processos de envelhecimento das células. Devido ainda à sua riqueza em ácidos gordos insaturados, este tem um importante papel na prevenção de doenças cardiovasculares e deve substituir em parte as gorduras saturadas na nossa alimentação (1-3). A grande diferenciação e os benefícios de saúde associados ao consumo do azeite está directamente relacionado à sua composição, que é rica em ácidos gordos monoinsaturados (como o ácido oleico) e baixo em saturados, o que favorece o controlo do colesterol. Assim, ajuda a equilibrar o colesterol “mau”(LDL - Low Density Lipoproteins) no sangue, aumentando o nível de colesterol “bom” (HDL - High Density Lipoproteins). Também se caracteriza pelo facto de ser o fornecedor principal de ácidos gordos poli-insaturados essenciais, que o organismo humano não pode sintetizar. A presença de hidrocarbonetos (esqualeno) no azeite favorecem ainda a excreção de toxinas, ajuda na saúde celular e tem ainda efeitos anti-carcinogénicos. Possui esteróis (β -sitosterol), que favorece a redução do colesterol e ajuda na prevenção e combate ao cancro (próstata, cólon, mama), possui compostos fenólicos que inibem a oxidação, reagem com radicais livres, inibindo a agregação plaquetária, previnem a oxidação do LDL e contém vitamina E, um poderoso antioxidante(3).

Para fazer face à competitividade no mercado do azeite, ao aumento de fabricantes e à categorização do azeite foi necessário começar a seguir certas regras, isto é, a cumprir requisitos de qualidade. Qualidade essa que durante muito tempo foi só controlada pela acidez. Hoje em dia já são analisados parâmetros químicos e organolépticos (análise sensorial), com base nas normas e regulamentos da Comissão Europeia (Tabela 1). Além da acidez, controla-se também o teor de ceras, índice de peróxidos, teor de esteróis (parte que se analisa neste trabalho), teor de eritrodiol e uvaol, teor de trilioleína, Delta K (variação da absorvância) $/K_{252}/K_{270}$, teor de solventes hlogenados voláteis, índice de iodo e mais recentemente a análise sensorial, entre outros (4, 5). A categorização e posterior rotulagem é feita de acordo com parâmetros químicos, sendo que a acidez livre (representa a proporção de ácidos gordos livres que o produto tem) só pode vir expressa se acompanhada do índice de peróxidos (indicador do grau de oxidação do azeite), do teor de ceras e da absorvância UV.

Assim o controlo do azeite serviu também para os classificar, e é segundo essa classificação (4, 5) que se apresenta as seguintes designações:

- “Azeite virgem extra: Azeite de categoria superior obtido directamente de azeitonas, unicamente por processos mecânicos”, este categoriza-se baseando-se na sua acidez que não pode passar de 0,8% em ácido oleico e também não pode apresentar defeitos sensorialmente.

- “Azeite virgem: Azeite obtido directamente de azeitonas, unicamente por processos mecânicos e com acidez máxima de 2%”
- “Azeite: contem azeite refinado e azeite virgem: Azeite constituído exclusivamente por azeites submetidos a um tratamento de refinação e por azeites obtidos directamente de azeitonas”
- “Óleo de bagaço de azeitona: óleo constituído exclusivamente por óleos provenientes do tratamento do produto obtido após a extracção do azeite e por azeites obtidos directamente de azeitonas ou óleo constituído exclusivamente por óleos provenientes do tratamento de bagaço de azeitona e por azeites obtidos directamente de azeitonas e com uma acidez livre expressa em ácido oleico não superior a 1%”
- “Azeite lampante: é um azeite virgem com acidez, expressa em ácido oleico, superior a 2%. Este tipo de azeite é impróprio para consumo”
- “Azeite refinado: azeite obtido a partir de azeite virgem lampante por métodos de refinamento. A sua acidez, expressa em ácido oleico, não pode exceder 0,3%. Neste tipo de azeite há perda parcial de antioxidantes relativamente ao azeite virgem, devido ao processo de refinamento a que este é submetido”

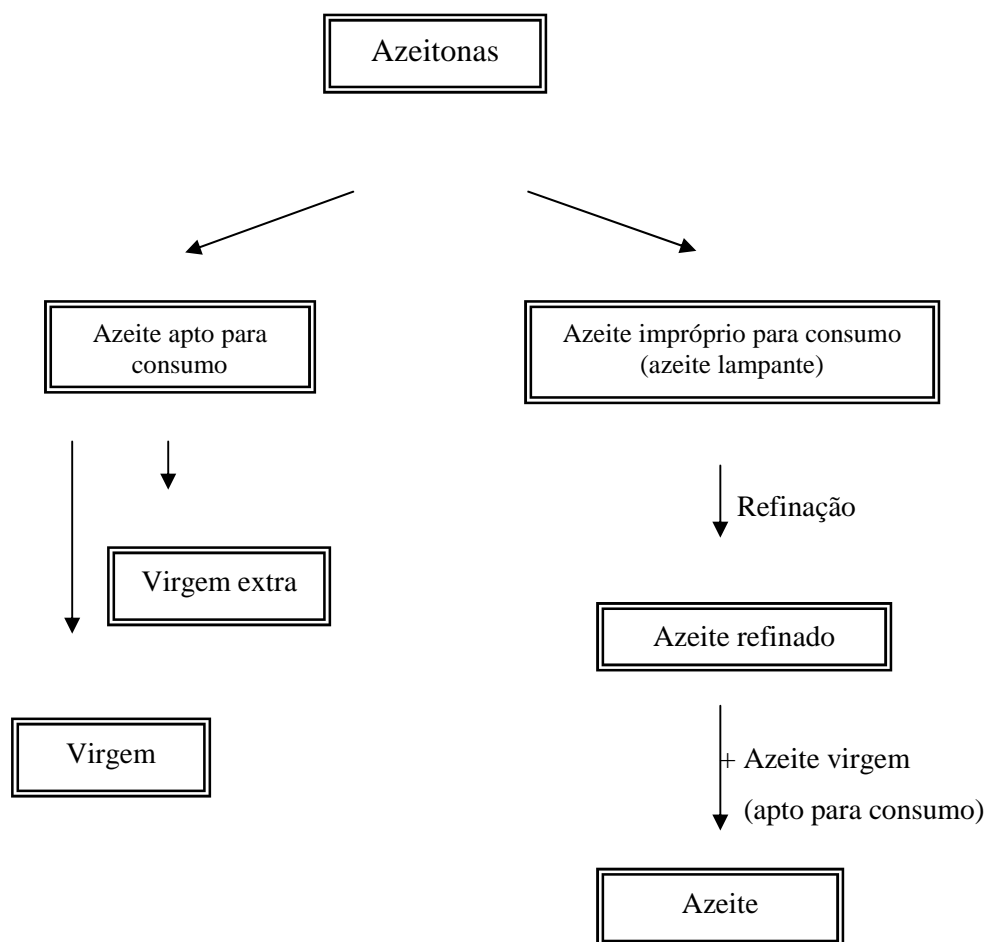


Figura 1 - Esquema representativo da classificação do azeite quanto à sua categoria (adaptado Regulamento (CE) N° 702/2007)

Estas designações dizem respeito à classificação do azeite quanto à sua categoria e deve vir expresso no rótulo do produto. Para poderem vir expressos nos rótulos é preciso fazer controlo de diversos parâmetros que foram expressos anteriormente e são esses que vão definir a categoria do azeite. Também se define a qualidade e autenticidade do azeite em relação a sua região, segundo os regulamentos europeus ele pode ser de Denominação de Origem Protegida (DOP) e Indicação Geográfica Protegida (IGP)(5).

Tabela 1 - Representação dos métodos utilizados para a análise química e sensorial do azeite com os valores limite correspondentes apresentados em cada categoria de azeite (adaptado Regulamento (CE) N° 702/2007)

Métodos	Categoria			
	AEV	AV	A	OBA
Determinação da acidez (%)	≤ 1,0	≤ 2,0	≤ 1,5	≤ 1,5
Determinação do índice de peróxidos meq 02/kg	≤ 20	≤ 20	≤ 15	≤ 15
Determinação do teor de ceras	≤ 250	≤ 250	≤ 350	> 350
Determinação do teor de esteróis	≥ 1 000	≥ 1 000	≥ 1 000	≥ 1 600
Determinação do eritrodiol e uvaol	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5	> 4,5
Determinação dos ácidos gordos saturados em posição 2 nos triglicérideos	≤ 1,3	≤ 1,3	≤ 1,5	≤ 2,0
Análise espectrofotométrica	É feita segundo a K232 e k270			
Determinação dos solventes halogenados voláteis mg/kg	≤ 20	≤ 20	≤ 20	≤ 20
Avaliação das características organolépticas dos defeitos	Só efectuado para azeites virgens			
Prova da refinação	Neutralização e descoloração do azeite em laboratório			
Determinação dos estigmastadienos	≤ 0,15	≤ 0,15	-----	-----

Legenda: AVE- azeite virgem extra; AV- azeite virgem; A- azeite e OBA- óleo de bagaço de azeitona

Geralmente o processo de fabrico do azeite envolve, de uma forma geral, quatro fases: a apanha, a trituração, a batadura e a extracção. Assim, o processamento para obter este elixir requer estes passos muito rigorosos e cuidados de modo a obter a melhor qualidade sensorial e química possível. De um modo genérico para a obtenção do azeite inicialmente colhe-se a matéria-prima desde o fim do verão ao início do inverno consoante a região e clima, a apanha poderá ser manual ou mecanicamente por vibração. De seguida, o transporte para o lagar, em que o principal controlo é evitar que haja contaminações e/ou fermentações indesejáveis, então será de evitar o transporte da matéria em sacos. Ao chegarem ao lagar, as azeitonas são classificadas, e acondicionadas em locais ventilados depois de terem sido lavadas e pesadas, estas são conservadas em tanques de salmoura e terão que ser processadas no máximo até 24 horas após a apanha. A moagem/trituração é que normalmente categoriza os diferentes azeites, esta pode ser feita mediante um sistema clássico em que as azeitonas são trituradas até se formar uma pasta que é pressurizada e aquecida de modo a facilitar a extracção, posteriormente, por diferença de densidades, o mosto e os óleos são separados por decantação. A extracção a nível industrial não se faz assim, faz-se por um sistema contínuo que poderá ser de 2 ou de 3 fases (Figura 2). No sistema de 3 fases, à pasta de azeitona adiciona-se água e por centrifugação são separados os sólidos dos líquidos, posteriormente, centrifuga-se o mosto originando o azeite e a água de lavagem. No sistema de duas fases, o processo é em muito semelhante ao anterior, é que em vez de se adicionar água à massa, a água existente no sistema sai conjuntamente com a fase sólida. Por último, o azeite é armazenado em depósitos de aço inoxidável com muito pouca luminosidade e temperaturas entre 15 e 18°C (3, 6, 7).

Baseando-se nos pressupostos abordados em que o azeite é um produto alimentar que apesar de consumido a larga escala, é um produto que requer fabrico e armazenamento muito cuidado, sendo que um programa de análise sensorial é um complemento para o controlo de qualidade deste produto (7).

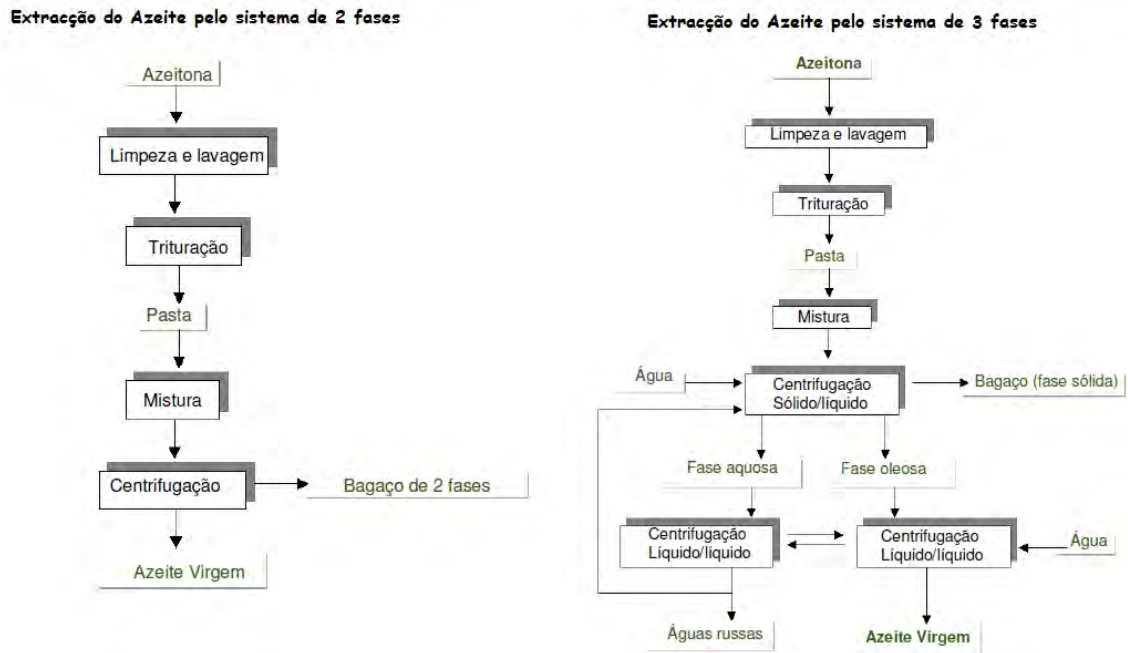


Figura 2 - Extracção de azeite pelo sistema de 2 e 3 fases, respectivamente (adaptado de “Olive Oil : Minor Constituents and Health”, 2009)

1.2 Composição química do azeite

Seguindo a tendência de outros óleos vegetais, o azeite é constituído por duas fracções, uma saponificável e outra insaponificável. A primeira, insolúvel em água, constitui 98,5 a 99,0% da composição do azeite, dá características não só físicas e químicas mas também metabólicas, inclui os triglicerídeos, ácidos gordos livres e componentes mais pequenos como fosfolípidos. A segunda representa 1 a 1,5 % da constituição do azeite e é composta por hidrocarbonetos, esteróis (compostos em estudo), ceras, álcoois triterpénicos, pigmentos como clorofilas e carotenóides, vitaminas, tocoferóis, polifenóis e substâncias voláteis (6, 8, 9) .

A composição do azeite, quer em termos quantitativos quer qualitativos, depende de muitos factores que estão relacionados com todo o processo de fabrico, desde a produção da azeitona até à obtenção do produto final. Estes factores são nomeadamente a variedade da azeitona, o grau de maturação, as condições ambientais a que o fruto está exposto, como a temperatura, a luz e a quantidade de água disponível, posteriormente as condições de processamento, como o tempo que

a pasta de azeitona está exposta ao ar, o tipo de moenda, o processo utilizado na separação do azeite, e das condições e do tempo de armazenamento do azeite.

1.2.1 Ácidos gordos

A maior parte dos ácidos gordos está presente na forma de triglicerídeos. Do total de ácidos gordos presentes no azeite, entre 53 a 87% correspondem a monoinsaturados, constituindo a principal característica do azeite, 4 a 20% a polinsaturados e 5 a 15% de saturados. O ácido oleico é o ácido gordo encontrado em maior quantidade, representando 55 a 83% do total dos ácidos gordos do azeite. De seguida vem o ácido linoleico, representando 7,5 a 20% do total de ácidos gordos, que tal como o ácido linolénico são ácidos gordos essenciais. Estes não são sintetizados pelo organismo e são essenciais à vida e à saúde humana, tendo por isso de fazer parte da alimentação (2).

Tabela 2 - Ácidos gordos existentes no azeite e respectiva proporção (adaptada de “Codex Alimentarius”, 2003)

Ácido gordo	Designação abreviada	Proporção (%)
Ácido láurico	(C 12:0)	Vestígios
Ácido mirístico	(C 14:0)	0.05
Ácido palmítico	(C 16:0)	7.5 - 20.0
Ácido palmítoleico	(C 16:1)	0.3 - 3.5
Ácido heptadecanóico	(C 17:0)	<0.5
Ácido heptadecenóico	(C 17:1)	<0.6
Ácido esteárico	(C 18:0)	0.5 - 5.0
Ácido oleico	(C 18:1)	55.0 - 83.0
Ácido linoleico	(C 18:2)	3.5 - 21.0
Ácido linolénico	(C 18:3)	<1.5
Ácido araquídico	(C 20:0)	<0.8
Ácido beénico	(C 22:0)	<0.3
Ácido erucico	(C 22:1)	Vestígios
Ácido linhocérico	(C 24:0)	<1.0

1.2.2 Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos são os constituintes principais da fracção insaponificável. São encontrados hidrocarbonetos terpénicos, como os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40).

Os terpenos são compostos derivados de um hidrocarboneto insaturado com cinco carbonos, o isopreno, tendo assim, sempre um número de carbonos múltiplo de cinco. Estes compostos resultam da associação de varias unidades isoprenicas de C5, na forma de isopentenilpirofosfato que é a forma activa do isopreno, sendo obtidas pela via do mevalonato ou por outra via independente da do mevalonato – a via do deoxixilulose fosfato, mais recentemente descoberta.

O esqualeno e os carotenóides são derivados terpenicos presentes no azeite. O esqualeno, representado na figura 3, é um triterpeno e é o hidrocarboneto que está em maior quantidade no azeite (até 40%) e é um precursor bioquímico dos esteróis.

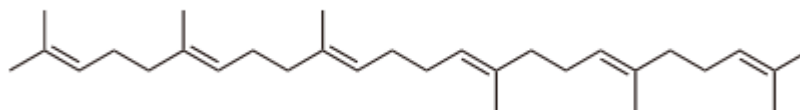


Figura 3 - Estrutura do esqualeno

Os carotenóides são tetraterpenos com um número elevado de duplas ligações que conferem aos alimentos de origem vegetal cores, que vão do amarelo ao vermelho. Os carotenóides maioritários no azeite são o β -caroteno e a luteína.

Para além de contribuírem para a cor, os carotenóides contribuem para a estabilidade do azeite protegendo-o da foto-oxidação, por inibição da acção dos radicais oxigenados. Estão ainda associados ao valor nutricional do azeite por serem precursores da vitamina A (2, 10).

1.2.3 Ceras

As ceras são álcoois de longa cadeia esterificados com ácidos gordos, também de longa cadeia. Ceras são um tipo de lipídeos e referem-se a misturas de cadeia longa de compostos polares, que podem ser classificados de acordo com as suas origens, isto é, como são produzidas, naturalmente ou sinteticamente. As que estão presentes naturalmente no ambiente podem ser subclassificadas em

ceras animais, vegetais, e ceras minerais. As vegetais, situam-se tanto no fruto (também na semente) como na folha, onde estão cobertas com uma camada de cera que é essencialmente uma capa impermeável, mas que também fornece protecção contra ameaças ambientais. Factores genéticos e ambientais influenciam a composição e a quantidade de cera, o que sugere que é um processo regulado activamente.

A qualidade e a estabilidade do azeite e de todos os outros óleos vegetais são influenciadas pela presença de ceras. Estas, são lipossolúveis a altas temperaturas, contudo tendem a cristalizar a temperaturas mais baixas, o que causa turbidez quando o azeite é arrefecido. Na tabela 3 pode ver-se a quantidade de ceras permitida nos diferentes tipos de azeite.

Tabela 3 - Quantidade de ceras nos diferentes tipos de azeite (adaptado do “Jornal Oficial da União Europeia”, Regulamento (CE) N.º 702/2007)

Tipo de azeite	Ceras (mg/kg)
Virgem extra	≤ 250
Virgem	≤ 250
Lampante	≤ 300
Refinado	≤ 350
Azeite	≤ 350
Óleo de bagaço de azeitona refinado	> 350
Óleo de bagaço de azeitona	> 350

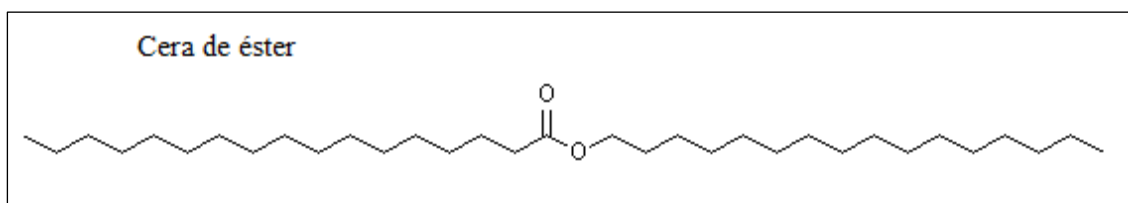


Figura 4 – Exemplo da estrutura de uma cera de éster (adaptado de “The lipid handbook”, 2007)

O conteúdo de ceras de ésteres é utilizado como um parâmetro de qualidade para avaliar óleos de alta qualidade, como o azeite virgem e o virgem extra. Por exemplo, o regulamento da União Europeia N.º 702/2007 exige a quantificação dos ésteres de ceras, pois óleos extraídos com solvente contêm consideravelmente uma maior quantidade de ceras que os óleos obtidos por prensagem a frio. Além disso, os padrões típicos de ceras específicos permitem o reconhecimento de adulteração de óleos de alta qualidade com óleos mais baratos, por exemplo, a adição de óleo de girassol em azeite. Na fracção cerosa, ésteres C40, C42, C44 e C46 são os menos afectados por

processos de solventes, e é por isso que a análise de cera é normalmente realizada tendo em conta apenas os ésteres de cera com um número par de átomos de carbono (10-12).

1.2.4 Compostos fenólicos

As características sensoriais do azeite são afectadas pela composição dos compostos fenólicos, que tem sido associada ao gosto amargo no azeite, contudo estes compostos são considerados os principais compostos com actividade antioxidante presente no azeite. Estes constituintes abrangem uma grande variedade, sendo a oleuropeína o composto fenólico mais característico do azeite (2, 6).

1.2.5 Vitaminas e tocoferóis

As vitaminas presentes no azeite são as vitaminas lipossolúveis, ou seja, a vitamina A, a vitamina E, a vitamina K e a vitamina D.

O α -tocoferol e o γ -tocoferol são as duas formas de tocoferóis existentes em maior concentração no azeite, apresentando características de vitamina E e de antioxidantes. Como antioxidantes estes compostos previnem ou retardam a oxidação lipídica e aumentam a estabilidade do produto final. Também em testes “in vivo” relatou-se resultados de actividade preventiva contra cancro, doenças cardiovasculares, inflamações crónicas, envelhecimento das células e outras doenças (2, 6, 8, 12).

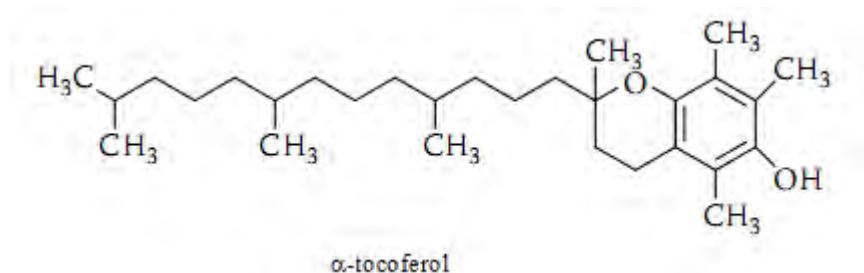


Figura 5 - Representação da estrutura do α -tocoferol (adaptado do livro “*Olive Oil : Minor Constituents and Health*”, 2009)

1.2.6 Esteróis

Os esteróis também estão representados na fracção insaponificável do azeite, podendo estar presentes como esteróis livres ou esterificados com ácidos gordos (6, 13-15). Estes compostos pertencem à classe dos esteróides, que são constituídos por um núcleo esteróide resultante da fusão de quatro anéis de hidrocarbonetos, denominado ciclopentanoperidrofenantreno, e uma cadeia lateral ligada ao núcleo esteróide no carbono 17, figura 6.

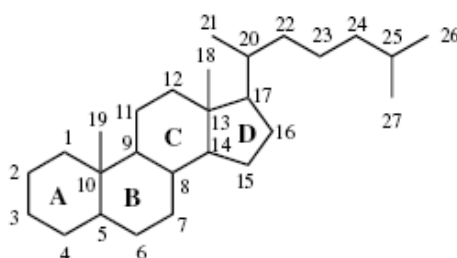


Figura 6 - Representação da fórmula geral dos esteróides (adaptado de “Food Lipids: *Chemistry, Nutrition and Biotechnology*”, 2008)

Os esteróis contêm um grupo hidroxilo no carbono 3 e podem possuir uma cadeia formada por 27 a 29 átomos. No caso específico das plantas estes são denominados por fitosteróis e a sua maioria é caracterizada por terem um ou dois carbonos extra na cadeia lateral, ligado ao carbono 24. Os vários esteróis diferem entre si pela presença de duplas ligações nos anéis A e B, e por diferenças na cadeia lateral, em número de carbonos ou presença de duplas ligações (2, 10, 14, 16).

A biossíntese de esteróis é feita a partir do esqualeno, que após uma reacção de epoxidação dá origem ao 2,3-epoxiesqualeno. Este cicliza formando quatro anéis e origina o cicloartenol (12, 16).

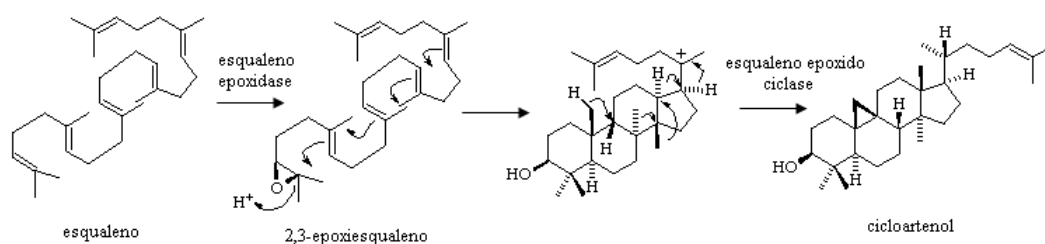


Figura 7 - Representação da ciclicação do esqualeno a cicloartenol (adaptado de “Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology”, 2008)

A formação dos diferentes esteróis a partir do cicloartenol dá-se por reacções, como a alquilação da cadeia lateral no carbono 24, a remoção dos grupos metilo dos carbonos 4 e 14 e a formação de duplas ligações. Estes esteróis provenientes das plantas, também chamados fitosteróis, estão divididos em 3 classes principais, 4-desmetilesterol, 4-monometilesterol e 4,4'-dimetilesterol. A classe maioritária é a do 4-desmetilesterol, que engloba o sitosterol, campesterol e estigmasterol (14).

Existe uma grande diversidade de fitosteróis presentes no azeite, nomeadamente, o brassicasterol, o 24-metilenocolesterol, o campesterol, o campestanol, o estigmasterol, o delta-5,23-estigmasdienol, o clerosterol, o beta-sitosterol, o colesterol, o sitostanol, o delta-5-avenasterol, o delta-5,24-estigmastadienol, o delta-7-estigmastenol e o delta-7-avenasterol. A estrutura destes compostos está representada na figura 8.

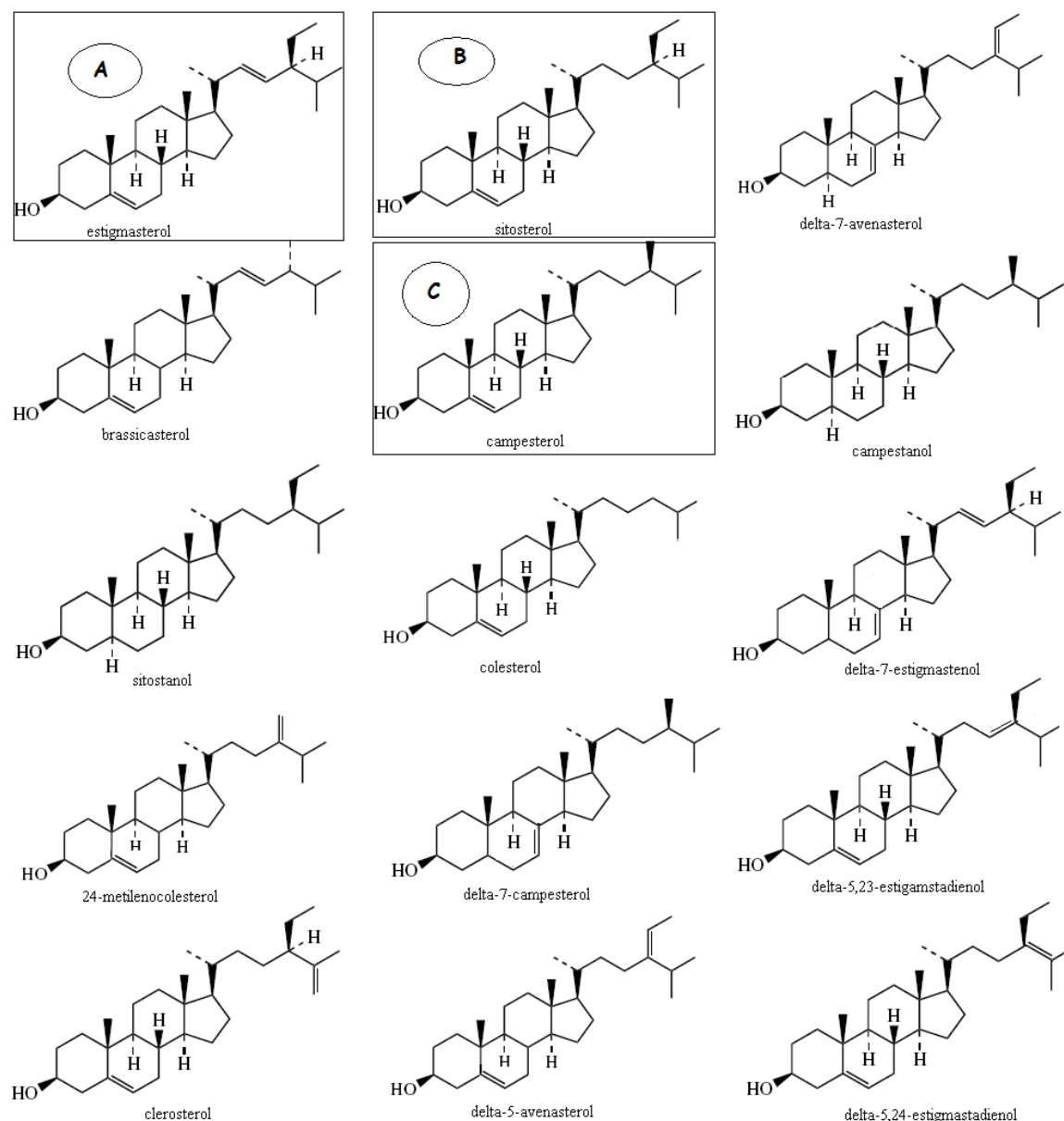


Figura 8 - Representação da estrutura dos fitosteróis presentes no azeite, com especial relevância para as estruturas (A, B e C) que vão ser quantificadas neste trabalho (adaptado de “The Mevalonate and Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. In *Medicinal Natural Product*”, 2001)

O fitosterol que se encontra em maior quantidade no azeite é o sitosterol, representando 50 a 80% do total de esteróis. O estigmasterol, o campesterol e o delta-5-avenasterol também são encontrados em níveis significativos, estando os restantes esteróis presentes no azeite em concentrações relativamente baixas. Este é o caso do colesterol que se encontra em quantidades tão baixas que normalmente, não apenas no azeite mas todos os produtos de origem vegetal, os produtos são considerados sem colesterol.

Na tabela 4 pode ver-se a percentagem de cada um dos diferentes esteróis presente no azeite, sendo que a percentagem de beta-sitosterol corresponde à soma das percentagens parciais do beta-sitosterol, do delta-5-avenasterol, do delta-5-23-estigmastadienol, do closterol, do sitostanol e do delta-5-24-estigmastadienol.

Tabela 4 - Representação da proporção de esteróis presentes no azeite conforme a sua categoria (reproduzido de “Jornal Oficial da União Europeia, Regulamento”, (CE) N.º 702/2007)

Categoria	Composição esterólica						Esteróis totais (mg/kg)
	Coolesterol (%)	Brassicasterol (%)	Camposterol (%)	Estigmasterol (%)	Betasitosterol (%) (1)	Delta-7-estigmastenol (%)	
Azeite virgem extra	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000
Azeite virgem	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000
Azeite lampante	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000
Azeite refinado	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000
Azeite (constituído por azeites refinados e azeites virgens)	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000
Óleo de bagaço de azeitona bruto	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500
Óleo de bagaço de azeitona refinado	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800
Óleo de bagaço de azeitona	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600

(1) Soma de: delta-5,23-estigmastadienol + closterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

1.3 Adulteração/autenticidade do azeite

A determinação de esteróis é uma das técnicas mais utilizadas na detecção de adulteração de azeite, isto porque o azeite tem características sensoriais excepcionais, a sua produção é limitada, a sua composição muito característica em alguns compostos de valor nutricional e ao seu elevado valor de mercado. A adulteração mais comum é a adição de outras categorias de azeite inferiores ou de outros óleos vegetais, ambos de menor valor comercial.

Por exemplo, está estabelecido que a presença de grandes quantidades de estigmasterol revela uma adulteração com óleos de semente de soja e algodão, que são mais baratos. Para se estabelecer

uma ideia dos limites, a observação da tabela 4 é essencial (16). Com o objectivo de prevenir adulterações, a União Europeia estabeleceu valores máximos para a composição dos esteróis no azeite, segundo o Regulamento (CE) nº2568/91. Alguns dos óleos que são adicionados ao azeite são provenientes de plantas como a soja, noz, avelã, amêndoa, canola, colza, mostarda, amendoim, girassol, algodão, milho e sésamo. Dado ao facto de as adulterações serem mais frequentes hoje em dia, a União Europeia tem vindo a gastar 4 milhões de euros por ano só no combate à adulteração com óleo estes óleos. Estas adulterações são difíceis de detectar principalmente com óleo de avelã, visto que, para níveis inferiores a 20%, a diferença de valores é quase indetectável. Para níveis acima dessa percentagem, pode ser detectada a adulteração usando a análise espectroscópica de Fourier transform infrared (FT-IR) combinado com análise multivariada (2, 14, 17).

2 *Análise instrumental de esteróis*

A análise dos esteróis segundo a norma europeia é feita através de diversas técnicas analíticas, nomeadamente a saponificação do azeite, a extracção da fracção insaponificável, o isolamento dos esteróis por cromatografia em camada fina e posteriormente a sua determinação e quantificação por análise em cromatografia de gás. Deste modo são testadas e propostas novas metodologias de análise do teor de esteróis no azeite, como a introdução da análise por IV (FTIR), a extracção em fase sólida (SPE) com várias colunas/cartucho e métodos mais simples e eficazes para efectuar a saponificação e a extracção/separação.

2.1 Saponificação

A saponificação é a reacção dos ésteres com bases alcalinas fortes, a qual promove a hidrólise e dá origem aos sais dos ácidos carboxílicos e ao glicerol (no caso dos triglicerídeos) (Figura 9). A base utilizada é preferencialmente o hidróxido de potássio (KOH), pois produz um sabão mole e assim os extractos obtidos não solidificam à temperatura ambiente [14].

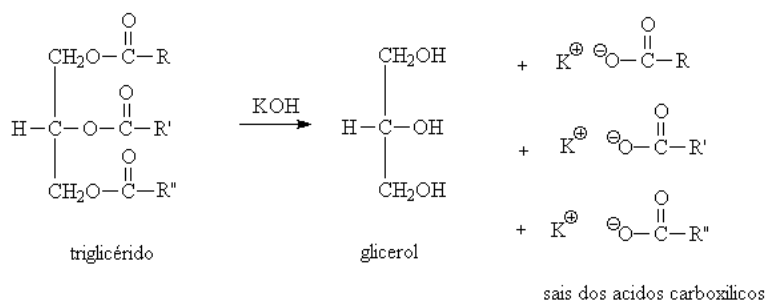


Figura 9 - Figura representativa da reacção de saponificação (adaptado do livro *Olive Oil : Minor Constituents and Health*, 2009)

No caso dos esteróis a reacção de saponificação hidrolisa a ligação dos ésteres de esteróis com ácidos gordos, dando origem a sais de ácidos carboxílicos e esteróis livres. Esta é a forma mais utilizada de converter os ésteres de esteróis em esteróis livres, para posterior quantificação.

2.2 Extracção em fase sólida (SPE)

2.2.1 Introdução

A extracção em fase sólida (SPE) é uma técnica cada vez mais útil na preparação da amostra, para isso são necessárias várias etapas, que podem ser executadas para matrizes gasosas, líquidas ou sólidas, consoante os tipos de analitos em estudo, nomeadamente compostos semi voláteis ou não voláteis (18, 19).

O principal objectivo dos métodos de preparação de amostra é transferir os analitos de interesse da matriz original da maneira mais adequada para o cartucho de extracção/separação. Dependendo da amostra utilizada, a análise poderá ser directa, se o eluído do cartucho estiver já enriquecido, senão deverão ser utilizados métodos de enriquecimento para os analitos em questão (19, 20).

A SPE é um método de preparação de amostras muito utilizado porque é bastante simples e económico. O modo de separação/extracção de um determinado composto nestas colunas é semelhante ao já descrito para a técnica de separação de cromatografia em coluna, com uma particularidade: enquanto em cromatografia em coluna todas as espécies são continuamente deslocadas ao longo da fase estacionária pela fase móvel, nestas colunas, a amostra é eluída por etapas sucessivas, ficando fracções retidas na fase estacionária, que só serão eluídas pela passagem de uma nova fase móvel adequada.

Utilizam-se neste método as chamadas colunas de extracção em fase sólida (Figura 10), que são geralmente usadas com fins preparativos. O principal objectivo da sua utilização é a extracção das espécies interferentes à análise de um determinado composto existente numa amostra por retenção das mesmas na coluna, ou alternativamente, a extracção de um determinado composto existente numa amostra por retenção do mesmo na coluna.

Ultimamente, a extracção em fase sólida tem vindo a substituir quase por completo a extracção líquido-líquido, uma vez ter provado ser uma técnica muito poderosa na preparação de amostras para análise cromatográfica, sendo comparativamente de mais rápida e fácil execução, exacta, precisa, consome quantidades reduzidas de solventes orgânicos, não envolve material de custo dispendioso, não forma emulsões e apresenta taxas de recuperação significativas. Embora o SPE exija por vezes um procedimento laborioso, apresenta ainda a particularidade dos cartuchos poderem ser reutilizados em sistemas no qual as amostras não estejam demasiado contaminadas (18-21).

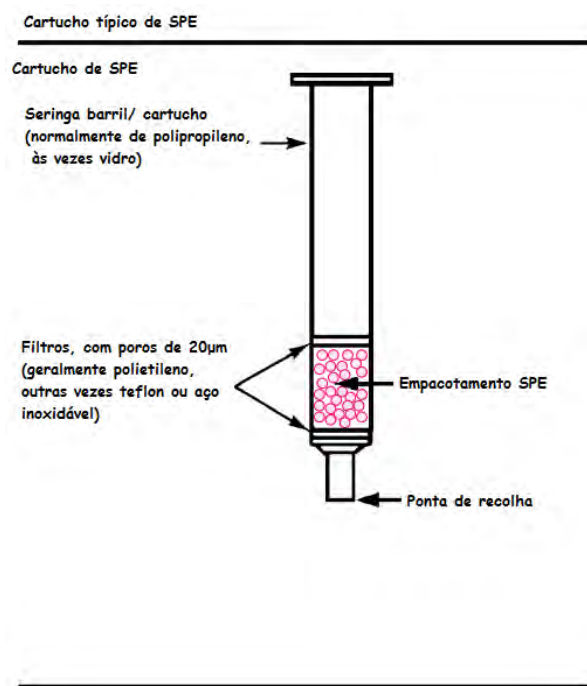


Figura 10 - Representação de uma coluna de extracção em fase sólida (adaptado de “General Chromatography”, 2009)

2.2.2 Composição das colunas de SPE

A fase estacionária de uma coluna de extracção em fase sólida é normalmente composta por um sólido inerte (frequentemente sílica) que pode possuir um determinado tipo de moléculas ligadas

quimicamente à sua superfície, variando a sua polaridade, que são responsáveis pelas interações que se estabelecem entre o adsorvente utilizado e os componentes da amostra. As interações que se estabelecem entre os componentes da amostra e o adsorvente utilizado podem ser de interações apolares, polares ou iónicas (18-20). As interações apolares ocorrem entre fases estacionárias constituídas por superfícies recobertas por moléculas orgânicas apolares (por exemplo, C8 e C18) e compostos da amostra apolares ou muito pouco polares. Estes compostos são retidos pelo estabelecimento de interações de Van der Waals com a fase estacionária. As interações polares ocorrem entre fases estacionárias polares, por exemplo, a sílica não modificada, Florisil (silicato de magnésio) ou sílica modificada quimicamente com CN, NH₂ ou OH e compostos polares. A interação da fase estacionária com os compostos polares deve-se, essencialmente, ao estabelecimento de ligações hidrogénio e interações dipolo-dipolo. As interações iónicas ocorrem entre compostos carregados existentes na amostra e fases estacionárias que contêm à sua superfície moléculas com grupos iónicos de carga oposta (18-20).

2.2.3 Etapas fundamentais ao SPE

A utilização da técnica de extracção em fase sólida engloba quatro passos fundamentais (figura 11): o condicionamento da coluna, a retenção dos componentes da amostra de interesse, a lavagem da coluna e por fim, a eluição dos componentes retidos na coluna (18-21).

(A) Condicionamento da coluna

Em colunas polares ou apolares, o condicionamento faz-se primeiro pela eluição de um volume de solvente de polaridade semelhante ao da fase estacionária da coluna (normalmente, três vezes o volume da coluna), e posteriormente, pela eluição de igual volume de uma solução similar em natureza ao solvente da amostra. O primeiro solvente a eluir tem por objectivo limpar a coluna de eventuais impurezas que esta possa conter e ainda homogeneizar a fase estacionária para a eluição da amostra. O segundo solvente, ao passar pela coluna, tem por principal objectivo eliminar vestígios do solvente anterior, cuja presença condicionaria o processo de extracção. O condicionamento de colunas de SPE de permuta iónica é feito simplesmente pela eluição de água ou solução tampão pela coluna.

(B) Retenção

Esta etapa consiste na eluição da amostra pela coluna. Independentemente da estratégia utilizada para a purificação da amostra (retenção da espécie a analisar ou retenção dos interferentes), o passo de eluição da amostra deve ser realizado de forma lenta (1-2 gotas/segundo), para que toda a fase estacionária seja uniformemente utilizada e ainda para garantir a extracção total das espécies da amostra a extrair.

(C) Lavagem da coluna

Após a eluição da amostra faz-se atravessar pela coluna uma nova porção de solução similar ao solvente da amostra. Este passo tem por finalidade eliminar de modo mais eficiente alguns compostos interferentes contidos na fase estacionária. Após este processo, a coluna de SPE é normalmente seca com auxílio de vácuo ou azoto;

(D) Eluição

A eluição constitui o último passo da técnica de SPE e consiste na passagem de um solvente adequado capaz de romper as interações existentes entre a fase estacionária e a espécie a analisar. Este passo deve ser efectuado o mais lentamente possível para garantir uma recolha quantitativa do analito retido.

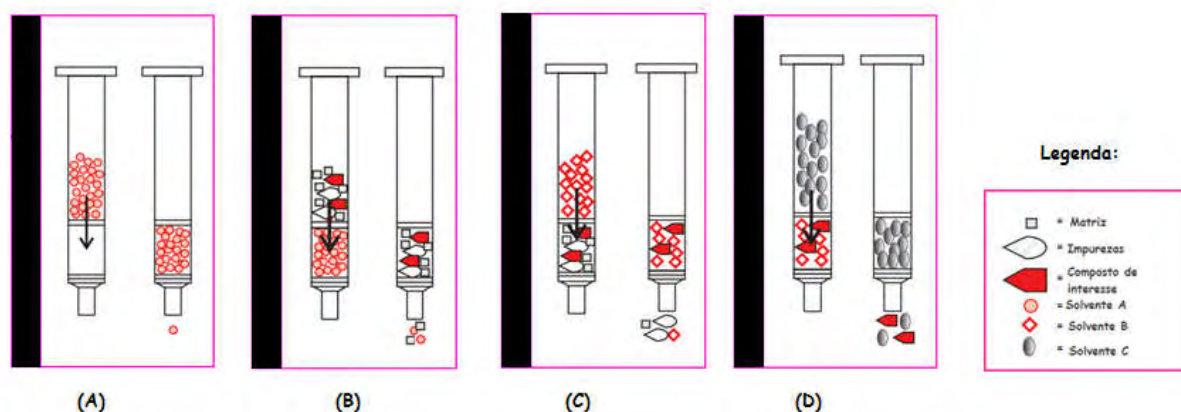


Figura 11 - Representação dos passos fundamentais no processo de SPE (adaptado de “General Chromatography”, 2009)

A eluição do solvente pode ser feita com a ajuda vários utensílios, utilizando um sistema de vácuo ou usando a centrifugadora, no caso do uso de muitas amostras ou como no caso em estudo, o uso de uma seringa para aplicar pressão, como demonstra a figura 12.

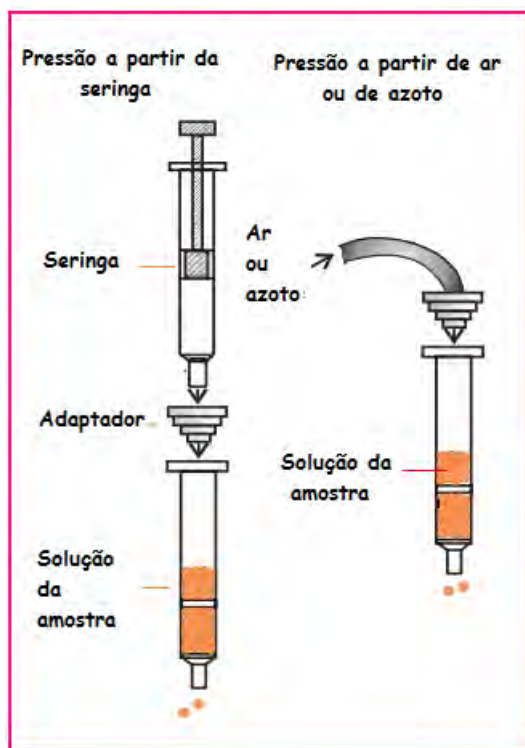


Figura 12 - Esquema representativo da eluição do solvente através da aplicação de pressão com uma seringa ou azoto (adaptado de “General Chromatography”, 2009)

2.3 Análise dos espectros de Infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho tem se revelado um técnica rápida e eficaz, não só quando utilizada sozinha, mas também quando em combinação com a análise multivariada (22).

As amostras de azeite após saponificação e após a extração em fase sólida foram estudadas espectroscopicamente através da análise de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-MIR).

O infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção a qual usa a região do infravermelho do espectro electromagnético. Como as outras técnicas espectroscópicas, ela pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. A espectroscopia de

infravermelho baseia-se no facto das ligações químicas das substâncias possuírem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais). Essas frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrónico. Se a molécula receber luz com exactamente a mesma energia de uma dessas vibrações, então a luz será absorvida desde que sejam atendidas a determinadas condições (23). Para que uma vibração apareça no espectro IV, a ligação correspondente precisa sofrer uma variação no seu momento dipolar durante essa vibração. A fim de se efectuar medidas numa amostra, um feixe de luz infravermelha (normalmente $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) é passada pela amostra, e a quantidade de energia absorvida é registada. Com base na interpretação do espectro de uma substância, o analista pode identificar informações dessa substância contidas no espectro. A espectroscopia de infravermelho é uma poderosa ferramenta analítica para a determinação de vários constituintes nos produtos agrícolas e alimentares visto que é uma técnica rápida, não destrutiva e multianalítica e esta não depende exageradamente da capacidade pessoal para utilizar o aparelho. A espectroscopia de infravermelho, neste trabalho permite-nos através da comparação e interpretação dos espectros, verificar se o melhor método para efectuar a saponificação e extracção e isso é feito devido à identificação das bandas espectrais que correspondem à elongação de grupos químicos e por comparação com um espectro modelo (14, 23).

A espectroscopia de infravermelho é utilizada na autenticação de azeites e tem sido capaz de discriminar diferenças entre óleos vegetais, e tipos de azeite em particular (24). Em anexo podemos encontrar uma tabela com o intervalo de frequência de cada banda e a descrição das suas composições (25).

A importância da espectroscopia IV na elucidação da estrutura molecular dos lipídios é de fornecer um alto conteúdo informativo sobre os compostos e assim ter a possibilidade de reconhecer as bandas de absorção específica particulares de alguns grupos funcionais. Assim, cada pico do espectro de IV de um azeite, representa a informação estrutural ou funcional de um grupo, quer seja dos lipídios, quer seja impurezas associadas a ele. Para uma melhor identificação dos picos dos espectros, para que seja possível comparar com as amostras eluídas e para de um modo concreto saber qual a melhor fracção a recolher para uma posterior análise dos esteróis é necessário perceber as principais características espectrais e as ligações predominantes nos lipídios (26), conforme a figura 13.

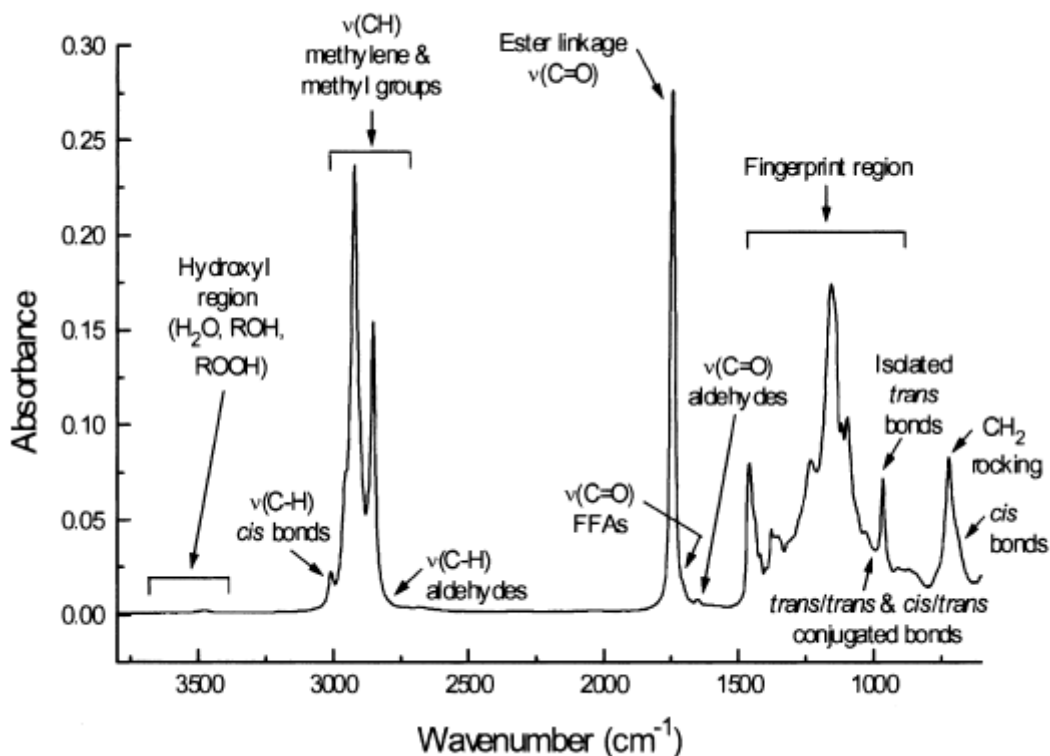


Figura 13 - Figura representativa de um espectro IV na gama entre 600 e 4000 cm^{-1} para os lipídios em geral, onde estão assinalados os principais picos com as correspondentes ligações (reproduzido de “Spectroscopy and spectrometry of lipids”, 2001)

2.4 Derivatização dos esteróis/Preparação dos trimetilsililéteres (TMSE)

Na derivatização os compostos de interesse são transformados em derivados com características adequadas para serem analisados em GC ou são introduzidos grupos específicos que aumentam a sua detectabilidade.

Os esteróis são normalmente analisados na forma de trimetilsililéteres (TMSE) devido à sua alta volatilidade e estabilidade durante a separação cromatográfica a altas temperaturas. Os grupos polares NH e OH que têm pontes de hidrogénio podem ser convertidos para grupos relativamente apolares e em um composto comparativamente não-volátil. O produto resultante pode ser menos polar, portanto, mais volátil, permitindo a análise por cromatografia gasosa. A derivatização faz com que os rendimentos sejam 6.0–8.7% maiores do que no caso da não derivatização dos

esteróis, sendo assim um passo importante para uma melhor quantificação (27). Por outro lado é preciso imenso cuidado nesta parte, uma vez que o reagente utilizado é cancerígeno e explosivo.

2.5 Cromatografia de Gás

A cromatografia gasosa (GC) é um tipo de cromatografia em que a fase móvel usada é um gás e o seu sistema cromatográfico é composto por um sistema de gases, um sistema de injeção da amostra, uma coluna cromatográfica e um detector (28).

Este tipo de cromatografia é utilizado para a separação de substâncias gasosas ou volatilizáveis. Para compostos voláteis, a volatilização pode ser conseguida com o aumento da temperatura do injetor e da coluna, contudo os compostos de alta massa molecular, como é o caso dos esteróis, têm de ser derivatizados para poderem ser analisados. Posteriormente, a quantificação dos diferentes esteróis é feita recorrendo ao uso de um padrão interno (figura 14), pela relação directa da área de cada pico com a área do pico do padrão interno. Mais especificamente, a cromatografia é um método físico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: a fase estacionária, e a fase móvel. A amostra injectada é transportada por uma corrente de gás através de uma coluna empacotada com um sólido recoberto com uma película de um líquido. O método consiste primeiramente na introdução da amostra em uma corrente de gás inerte, normalmente hidrogénio ou hélio, que actuará como gás de arraste. As amostras líquidas vaporizam-se antes de serem arrastadas pelo gás. O fluxo de gás passa pela coluna capilar através da qual os componentes da amostra se deslocam a velocidades influenciadas pelo grau de interacção de cada componente com a fase estacionária não volátil. As substâncias que têm a maior interacção com a fase estacionária são retidas por mais tempo e, por tanto, separadas daquelas de menor interacção. À medida que as substâncias eluem da coluna, podem ser quantificadas por um detector, que neste caso é o FID.

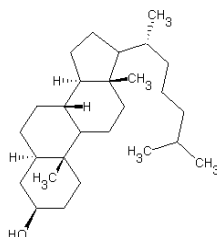


Figura 14 - Estrutura do padrão (5 α -Cholestan-3 β -ol)

3 SPE versus TLC

Durante os últimos anos, diferentes metodologias têm sido testadas para quantificar esteróis em óleos vegetais. Uma delas é a utilização de SPE, em substituição, da já utilizada e mais antiga, cromatografia de camada fina (TLC). De acordo com alguns estudos (15, 29), pode-se verificar a que o uso de SPE leva uma certa vantagem em relação à utilização de TLC. Um exemplo é apresentado na seguinte tabela (15, 29):

Tabela 5 - Representação das percentagens de recuperação de dois métodos de extracção, TLC e SPE (cartucho 1 g sílica)

Esterol	<i>TLC ± desvio padrão (dp)</i> <i>(% recuperação)</i>	<i>SPE (cartucho 1 g sílica) ± desvio padrão (dp)</i> <i>(% recuperação)</i>
Sitosterol	64.6 ± 9.5	95.7 ± 10.9
Campesterol	60.7 ± 2.1	91.0 ± 4.3
Estigmasterol	61.3 ± 2.9	94.3 ± 6.0

O método tradicional de TLC para separar os esteróis tem várias sequências de preparação da amostra com possíveis fontes de erro, muito tempo gasto no procedimento e um elevado gasto de solventes. Por outro lado o método de SPE é melhor para separar os esteróis porque é mais simples, rápido e com maiores percentagens de recuperação.

4 Objectivos

O objectivo do trabalho foi testar uma metodologia alternativa para determinação do teor de esteróis em azeite, simplificando o método processual em relação ao método oficial, bem como a introdução de Infravermelho (IV) para monitorizar a saponificação e para análise de possíveis contaminações.

Parte II - Materiais e Metodologia

1 Preparação do insaponificável

1.1 Métodos de saponificação testados

Para esta parte foi utilizado como amostra dois tipos azeite, um azeite comercial e outro referente a um óleo de bagaço de azeitona. Utilizou-se também, em vez de um balão e duas ampolas de decantação, um novo instrumento para facilitar o processo de saponificação (Figura 15 e 16), evitando assim perdas ao longo dos processos de transição e facilitando o trabalho do operador. Nos métodos apresentados variou-se alguns factores, como a temperatura, concentração da base utilizada e também a quantidade de amostra.



Figura 15 – Instrumento inovador adaptado à realização da saponificação, desenvolvido na Universidade de Aveiro (I. Delgadillo - A. Morais)



Figura 16 – Representação de alguns passos do procedimento de saponificação

1.1.1 Método de preparação do insaponificável 1

Começa-se por adicionar a 5g de azeite seco, 500µL de solução de colestanol como padrão interno (PI) de 1mg/mL em hexano. A esta mistura junta-se 50 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio 2 M (130 g de hidróxido de potássio em 200 ml de água destilada e completa-se até um litro com etanol). De seguida, procede-se à saponificação, aquecendo a solução anterior até uma ligeira ebulição. Depois da realização da saponificação (20 minutos com refrigerador de refluxo) e do arrefecimento, extrai-se o insaponificável com éter etílico (cerca de 70 mL duas vezes), lava-se com água e depois de eliminar a água, seca-se com sulfato de sódio anidro. Por fim, a fracção insaponificável é concentrada, evaporando o solvente (30).

1.1.2 Método de preparação do insaponificável 2

A saponificação a frio do azeite e do óleo de bagaço (250 mg de amostra e 250 µL de colestanol (1mg/mL) foi feita em concordância com o método descrito a seguir (31). Resumindo, 10 mL KOH (1M) em 95% de etanol foram adicionados para a amostra de azeite dissolvida primeiramente em 3mL de diclorometano. Esta mistura foi vigorosamente agitada e ficou o resto da noite num local escuro à temperatura ambiente. Depois adicionou-se 10mL de diclorometano e 7mL de água, agitando-se vigorosamente a mistura para extrair a fracção insaponificável contendo os esteróis não oxidados e também os seus produtos de oxidação. Depois de remover a fase aquosa, a fase orgânica foi lavada com água repetidas vezes até a solução ficar limpa. A fase orgânica (diclorometano) foi seca sob corrente de nitrogénio.

1.2.3 Método de preparação do insaponificável 3

Com o fim de minimizar o consumo de reagentes testou-se este método com menor quantidade de amostra. Foram adicionados a cada fracção de óleo (250 mg de amostra), 250 µL de colestanol (1 mg/mL), 5ml de 1M KOH em solução etanólica. A solução foi aquecida 30 minutos a 80 °C, depois foi adicionado água (10ml) e a matéria insaponificável foi extraída duas vezes com di-etil éter (10ml). A fracção de di-etil éter foi lavada com 2ml×5ml de KOH a 0.5 M e água (7.5ml) e finalmente foi seca com sulfato de sódio anidro (32).

1.2 Separação da fracção esterólica

1.2.1 Métodos testados

Para esta fase do trabalho foram testados vários procedimentos com diferentes colunas de SPE (Figura 16). Foram utilizadas colunas de fase normal da marca Grace Pure Florisil® (Silicato de magnésio, 6 mL), Grace Pure Sílica® (Sílica, 6 mL) e de fase reversa a Varian Bond Elut C18 (Sílica derivatizada, 3 mL).

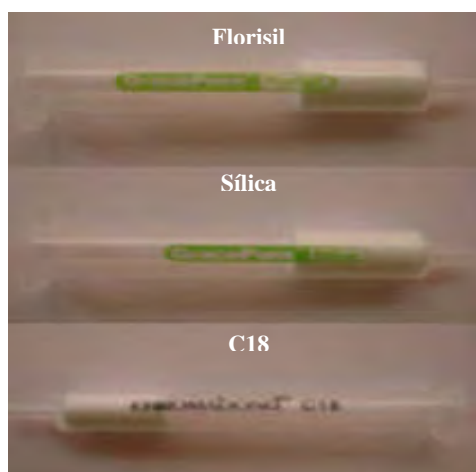


Figura 17 – Exemplo dos cartuchos de SPE utilizados

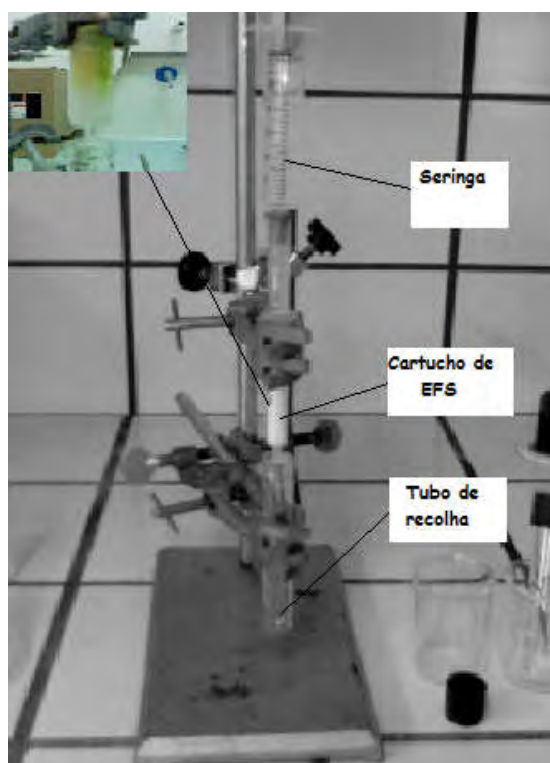


Figura 18 – Representação ilustrativa do procedimento de separação dos esteróis

1.2.1.1 Método SPE 1 – Sílica ou Florisil

Para este método é apresentado o procedimento abaixo descrito (15), com as respectivas quantidades solventes a utilizar. É um método adaptável tanto para colunas de sílica, como colunas de florisil.

- Condicionar o cartucho com 5 mL de hexano
- Aplicar o insaponificável (dissolvido em 5 mL de hexano)
- Lavar, eluindo os compostos não esteróicos apolares usando 40 mL de hexano:dietiléter (99:1)
- Eluição dos 4,4'-dimetilesteróis usando: 40 mL de hexano:dietiléter (99:1) e 10 mL hexano:dietiléter (99:2) **-(1)** - recolher
- Lavar com 10 mL de hexano:dietiléter (99:2)
- Eluição dos 4-monometilesteróis usando 20 mL de hexano:dietiléter (99:2) **-(2)** - recolher
- Lavar com 5 mL de hexano:dietiléter (99:2)
- Eluição dos 4-desmetilesteróis usando 5 mL de hexano:dietiléter (60:40) **-(3)** - recolher

1.2.1.2 Método SPE 2 - Sílica ou Florisil

Aqui, o método é testado segundo o procedimento abaixo descrito (31), com as respectivas quantidades de solventes a utilizar. É um método adaptável tanto para colunas de sílica, como colunas de florisil.

- Condicionar o cartucho com 5 mL de hexano
- Aplicar o insaponificável dissolvido em 1 mL de hexano:dietiléter (90:10)
- Lavar com 15 mL hexano:dietiléter (90:10) **-(1)** - recolher
- Lavar com 10 mL hexano:dietiléter (50:50) **-(2)** - recolher
- Eluição dos fitosteróis com 10 mL de acetona **-(3)** - recolher
- Secar em corrente de azoto

1.2.1.3 Método SPE 3 – Sílica ou Florisil

Neste método é testado o procedimento abaixo descrito (32), com as respectivas quantidades de solventes a utilizar. É um método adaptável tanto para colunas de sílica, como colunas de florisil.

- Condicionar o cartucho com 5 mL de hexano
- Aplicar o insaponificável dissolvido em 1 mL de hexano:etil-acetato (90:10)
- Eluição com 2,5 mL de hexano:etil-acetato (90:10) -(1) - recolher
- Eluição com 5 mL de hexano:etil-acetato (90:10) -(2) - recolher
- Eluição com 3 x 5 mL de etanol:di-etil-éter:hexano (50:25:25) -(3) - recolher

1.2.1.4 Método SPE 4 - Fase reversa C18

Por fim é testado o método que utilizou o procedimento abaixo descrito, com as respectivas quantidades de solventes a utilizar. É um método só adaptável a colunas de fase reversa C18.

- Pré-condicionamento com metanol (5ml) e água (5ml)
- Aplicar o insaponificável dissolvido em 1 mL de clorofórmio:metanol (95:5), colocando-o no cartucho de forma lenta e cuidada, de modo a evitar que a eluição comece imediatamente.
- Eluição com 15 mL de clorofórmio:metanol (95:5) -(1)- recolher

1.3 Espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-MIR)

O espectrómetro de infravermelho com transformada de Fourier utilizado para a obtenção dos espectros foi o modelo Spectrum BX da PerkinElmer. O acessório para aplicar a amostra foi um ATR horizontal de uma reflexão, Golden Gate da Specac. O procedimento desta análise é

muito simples, basta abrir o software Spectrum do computador que se encontra ligado ao espectrómetro e introduzir no método a resolução, número de scans e região espectral que se deseja. De seguida selecciona-se o método criado, efectua-se um *background* com a célula de ATR limpa e seca. Depois coloca-se o nome da amostra que se pretende analisar, coloca-se uma gota de amostra no cristal de diamante do espectrómetro com o auxílio de uma espátula, obtendo-se de seguida o espectro do óleo. O *background* efectua-se antes da análise de cada uma das amostras. Entre amostras deve-se limpar muito bem com papel e um pouco de acetona, de modo a não contaminar outras análises. O método usado abrangia a região espectral de 4000-600 cm^{-1} , com 8 cm^{-1} de resolução e com 16 scans.

1.4 Derivatização/Preparação dos trimetilsililéteres (TMSE)

- No tubo de centrifugação que contém a fracção esteróica seca, junta-se o reagente de sililação, constituído por uma mistura (9 + 3 + 1) de piridina, hexametildissilazano e trimetilclorossilano (existem no comércio soluções prontas para utilização como a que se usou, HMDS:TMCS:pyridine 3:1:9, SIL-PREP Kit, Alltech) numa proporção de 50 μl por miligrama de esteróis, evitando qualquer absorção de humidade (nota*).

- Tapa-se o tubo de centrifugação agita-se cuidadosamente (sem virar) até à solubilização completa dos esteróis. Deixa-se repousar durante pelo menos 15 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida, centrifuga-se durante alguns minutos: a solução límpida está pronta para análise por cromatografia em fase gasosa.

Nota *: A ligeira opalescência que se pode eventualmente formar é normal e não provoca qualquer perturbação. A formação de um floculado branco ou o aparecimento de uma coloração rosa indicam a presença de humidade ou a deterioração do reagente. Neste caso, a análise deve ser repetida.

1.5 Cromatografia Gasosa

O sistema de cromatografia em fase gasosa era constituído por um cromatógrafo a gás Perkin Elmer® Clarus 400 equipado com sistema de injeção, coluna SPB™ -5 (Fused silica capillary

collum, 15 m × 0.25 mm x 0.25 µm) e um detector de ionização de chama. A análise qualitativa e quantitativa do esteroide (sob a forma de trimetilsililéteres) foi realizada, utilizando um método do padrão interno (5 α -Cholestan-3 β -ol; 99%; Sigma) e também recorrendo às soluções de compostos padrão como colesterol (Panreac) e β -sitosterol (Fluka AG; 60%;contendo também campesterol e estigmasterol).

1.5.1 Condições de funcionamento

As condições de funcionamento normais são as seguintes:

- temperatura do injector: 270° C,
- Programa Temperatura inicial: 250 °C, subir gradualmente 2°C por minuto até 300 °C e deixar 12 minutos.
- temperatura do detector: 310° C,
- velocidade linear do gás vector: Hélio, 20 a 35 cm/s; hidrogénio, 30 a 50 cm/s,
- relação de separação: de 1/50 a 1/100,
- sensibilidade instrumental: 4 a 16 vezes a atenuação mínima,
- sensibilidade de registo: 1 a 2 mV em escala de fundo,
- velocidade do papel: 30 a 60 cm/hora,
- quantidade de substância injectada: 1 µL de solução TMSE.

1.5.2 Execução da análise

Com a micro-seringa de 10 µl, colhe-se 1 µl da amostra a analisar. Introduce-se a agulha através do septo do injector e após 1-2 segundos, injecta-se rapidamente, retira-se a agulha devagar, cerca de 5 segundos depois. Proceda-se ao registo até à eluição completa dos derivados sililados dos esteróis presentes (30).

1.5.3 Identificação dos picos

A identificação individual dos picos é efectuada com base nos tempos de retenção e em comparação com a mistura dos TMSE dos esteróis cromatografados nas mesmas condições. Os

esteróis são eluídos pela seguinte ordem: colesterol, brassicasterol, 24-metilenocolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, delta-7-campesterol, delta-5,23-estigmastadienol, closterol, beta-sitosterol, sitostanol, delta-5-avenasterol, delta-5,24-estigmastadienol, delta-7-estigmastenol, delta-7-avenasterol. Assim recorrendo a esta ordem podemos identificar os picos que vamos quantificar neste trabalho, que são o do beta-sitosterol, campesterol e estigmasterol (30). Para confirmar a ordem e tempo de eluição, foram injectados padrões dos esteróis que se iriam quantificar.

1.5.4 Avaliação quantitativa

Procede-se com o integrador ao cálculo da área dos picos do alfa-colestanol e dos outros esteróis. Calcula-se o teor de cada esterol (30), em mg/Kg de matéria gorda, do seguinte modo:

$$\text{esterol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

Onde:

A_x = área do pico do esterol x, em %;

A_s = área do pico de alfa-colestanol, em %;

m_s = massa do alfa-colestanol adicionado, em miligramas;

m = massa da amostra usada para a determinação, em gramas.

1.5.5 Expressão dos resultados

Registrar as concentrações individuais de esteróis em mg / kg de matéria gorda, bem como a sua soma como "esteróis totais" e calcular a percentagem de cada esteroide individual a partir da relação entre o área de pico relevantes para a área máxima total de esteróis (30).

$$\% \text{ do esteroide } x = \frac{A_x}{A_T} \cdot 100$$

Onde:

A_x = área do pico x ;

A_T = soma das áreas de todos os esteróis

Parte III - Resultados e Discussão

De modo a otimizar o registo e tratamento dos resultados experimentais, esta secção encontra-se dividida em duas partes. A primeira parte descreve os resultados obtidos em IV, comparando os vários métodos de saponificação e os diferentes procedimentos de SPE, enquanto na segunda parte são apresentados os resultados referentes à análise de GC.

1 *Análise em IV*

Nesta primeira parte são apresentados os espectros de IV provenientes da comparação dos diferentes métodos de saponificação e SPE com o padrão (5 α -Cholestan-3 β -ol ou colestanol) e azeite.

Os picos característicos do colestanol, que são identificados segundo a tabela (que se encontra em anexo), estão assinalados no espectro a seguir representado. Encontra-se uma banda larga a 3370 cm⁻¹ característica dos álcoois, que corresponde à distensão da ligação O-H, encontram-se dois picos observados entre 2850 e 2930 cm⁻¹ característicos das ligações C-H saturadas, a banda encontrada entre 1430 e 1480 cm⁻¹ corresponde aos grupos metilo. Pode ainda, observar-se o desdobramento da banda do grupo isopropilo com picos de intensidade entre 1365 e 1380 cm⁻¹, que são confirmados por uma banda a 1170 cm⁻¹, como se pode ver na figura seguinte. O espectro apresenta ainda outras bandas características á distensão do C-O entre 1200 e 1000 cm⁻¹ (zona da impressão digital). Também estão representados os picos a 1720 e 1745 cm⁻¹, que podem corresponder a impurezas de triglicérideos (26, 27).

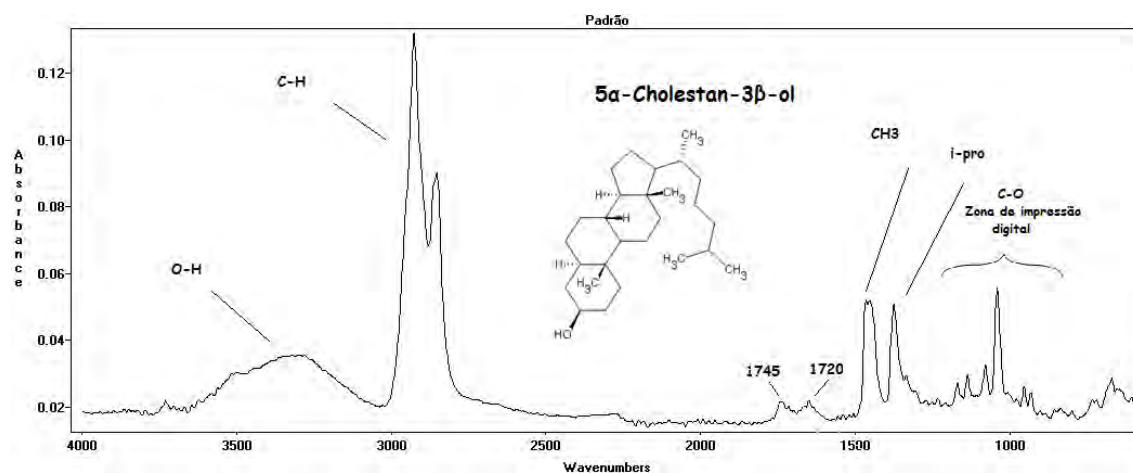


Figura 19 - Espectro de infravermelho representativo do padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

O espectro IV do azeite abaixo apresentado, serviu para ver até que ponto a saponificação foi feita. Para uma melhor compreensão do espectro consultar a figura 13.

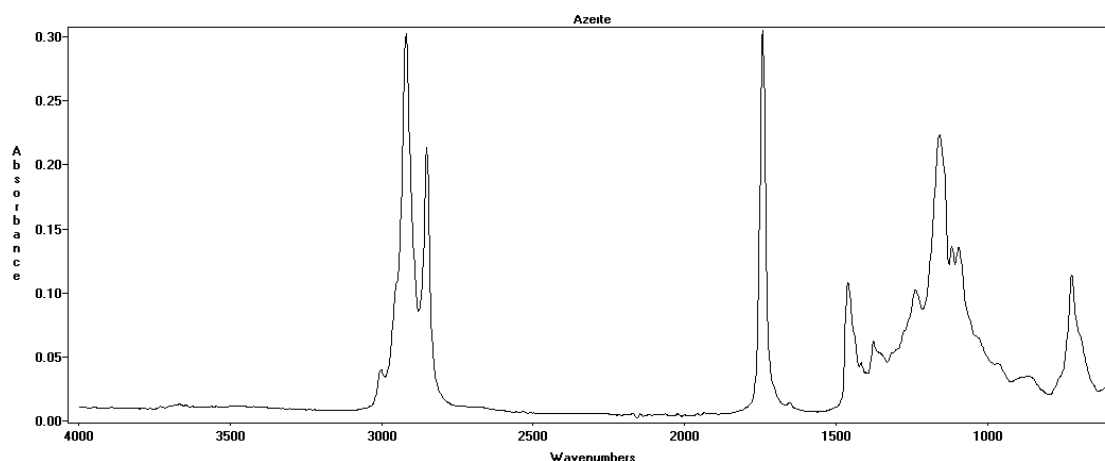


Figura 20 - Espectro de infravermelho representativo do azeite, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

1.1 Saponificação

Para a saponificação (hidrólise alcalina de azeite), foi utilizado excesso de KOH em diferentes solventes e em diferentes concentrações. Uma composição incorrecta pode aumentar a formação de espuma interferindo na separação, diminuindo o rendimento da saponificação. Um detalhe importante é o solvente utilizado na dissolução do padrão interno antes da hidrólise isto porque, o uso de clorometanos pode por um lado facilitar, como bom solvente, mas por outro, não ser a

melhor opção, por poder reagir com os produtos alcalinos e criar produtos adicionais (27). Assim introduziu-se a espectroscopia de infravermelho (FTIR), como um rápido método de detecção de contaminações, verificação da separação dos produtos e para análise do procedimento de extracção.

Na figura seguinte está representado o espectro que caracteriza a fracção insaponificável contaminada com triglicerídeos (A) e a fracção insaponificável não contaminada (B). Esta figura vai ajudar a perceber e identificar as fracções que estão contaminadas, assim como ajudar a escolher as fracções prontas para a análise em GC. É possível ver no espectro A (Figura 21), conforme indica a seta, na zona entre 1720 e 1745 cm^{-1} existe um forte sinal carbonil que corresponde à contaminação acima referida (27).

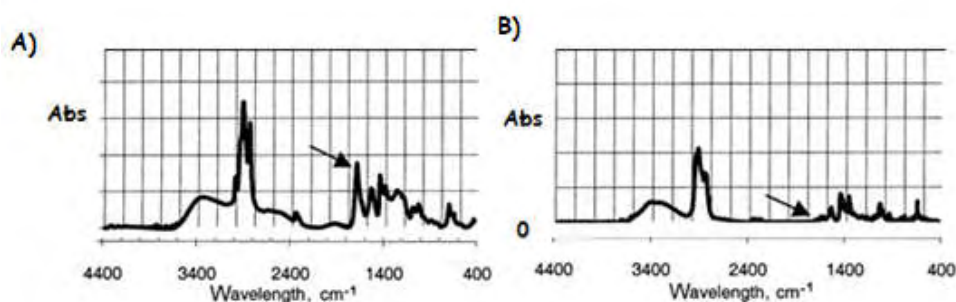


Figura 21 - Espectros IV representativos da fracção insaponificável contaminada com triglicerídeos (A) e a fracção insaponificável não contaminada (B), depois da extracção (adaptado de “Some important aspects of sterol analysis of vegetable oils”, 2001)

Após a saponificação da amostra de azeite, o material insaponificável tem que ser separado da mistura de sais de ácidos gordos alcalinos, glicerol e do excesso de alcalinidade do solvente utilizado. Uma composição incorrecta pode invocar a formação de espuma ou apenas incomodar a separação, diminuindo o rendimento de transição. Assim o excesso de alcalinidade (KOH) é utilizado para garantir a hidrólise completa, mas esse excesso vai se notar e continuar a marcar presença na mistura após saponificação, sendo que ele vai desactivar a sílica. Assim, as fracções insaponificáveis separadas deverão ser lavadas com água exaustivamente para evitar ser contaminadas com ácidos gordos dissolvidos e alcalinidade.

Resultados e Discussão

Nesta fase do trabalho, as várias partes insaponificáveis resultantes de cada método de saponificação foram comparadas com o padrão e com o azeite. Primeiro foi feita a comparação para o método de saponificação 1, conforme os seguintes espectros.

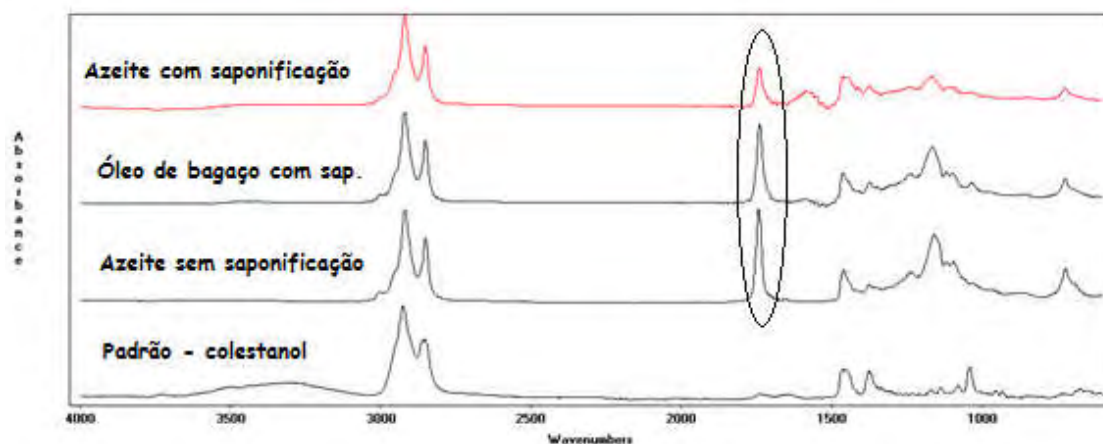


Figura 22 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das frações insaponificáveis (método saponificação 1) com azeite e padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

Em segundo lugar foi feita a comparação para o método de saponificação 2, conforme os espectros abaixo.

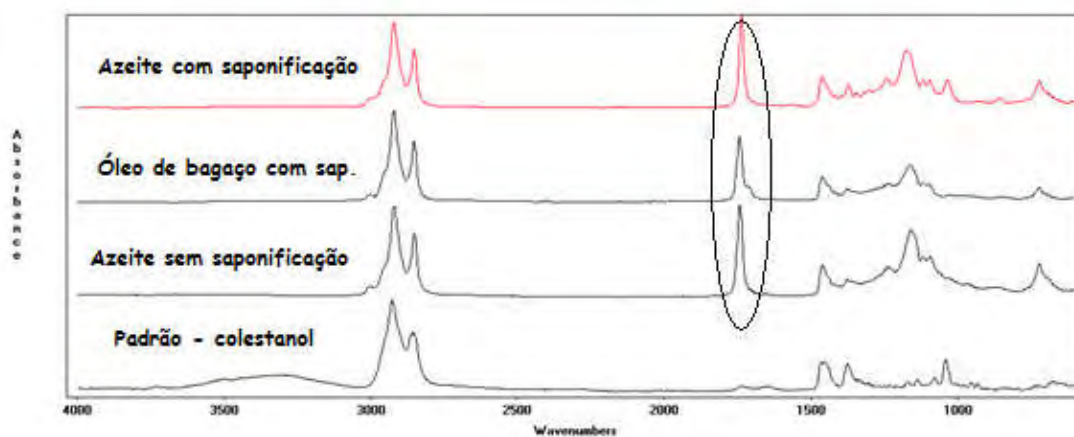


Figura 23 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das frações insaponificáveis (método saponificação 2) com azeite e padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

Em terceiro lugar foi feita a comparação para o método de saponificação 3, conforme os espectros abaixo.

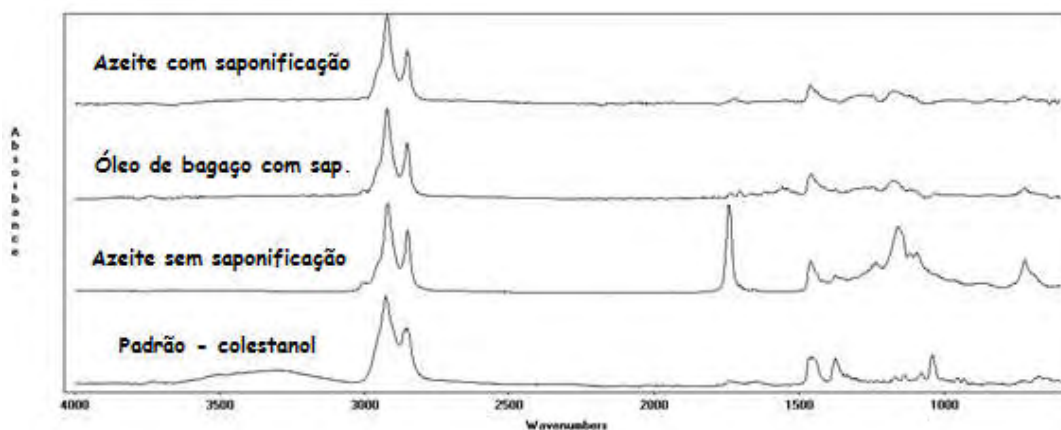


Figura 24 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções insaponificáveis (método saponificação 3) com azeite e padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

Em relação aos resultados obtidos e após a visualização e análise dos espectros, pode-se verificar que as fracções insaponificáveis (método 1 e 2) apresentam sinais na zona de 1720 a 1745 cm^{-1} . Dos três métodos apresentados o que apresenta melhores resultados é o terceiro. Para o método de saponificação 1, verifica-se que a saponificação não foi total, pois esta apresenta semelhanças com o espectro do azeite nomeadamente o pico a 1745 cm^{-1} , originado pelo grupo éster dos triglicérideos. Para o método de saponificação 2, verifica-se o mesmo que para o método 1. Para o método de saponificação 3, a saponificação parece ter sido efectuada praticamente na totalidade, visto que no espectro os picos referentes aos ésteres desapareceram.

1.2 SPE

Depois de analisar as fracções insaponificáveis e de ver possíveis amostras com possíveis falhas na saponificação, escolheu-se o método de saponificação que apresentava melhores resultados, trabalhando-se com esse método para o resto do procedimento. De seguida procedeu-se à análise das fracções eluídas para cada método de SPE (para diferentes tipos de colunas) e verificou-se também qual desses métodos demonstrou melhores resultados. As amostras com o número 1 a frente são referentes ao azeite e com o número 2 referentes ao óleo de bagaço de azeitona.

Tabela 6 – Métodos extracção e tipo de coluna utilizados para cada amostra de azeite e óleo de bagaço de azeitona

Amostras	Método de extracção	Tipo de coluna
A1/A2	SPE 2	Sílica
H1/H2	SPE 2	Florisil
C1/C2	SPE 1	Sílica
D1/D2	SPE 1	Florisil
E1/E2	SPE 4	C18
F1/F2	SPE 4	C18
G1/G2	SPE 3	Florisil
B1/B2	SPE 3	Sílica

Método SPE 1 – (Sílica ou Florisil)

Os seguintes espectros são respeitantes às fracções eluídas no método SPE 1. O cartucho de SPE utilizado foi a de sílica.

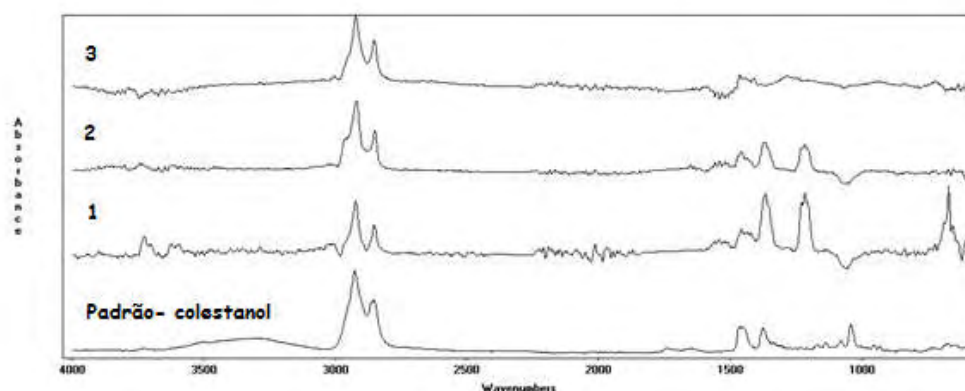


Figura 25 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 1; cartucho de SPE de sílica; amostra C1) com o padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

Pode-se observar picos não característicos do padrão nas fracções eluídas, o que significa que este não será o melhor método para efectuar a separação. Isto porque, o mesmo aconteceu para os restantes espectros das amostras que utilizaram o método SPE 1.

Método SPE 2 – (Sílica ou Florisil)

Os seguintes espectros são respeitantes às fracções eluídas pelo método SPE 2. As colunas de SPE utilizadas foram de sílica e florisil.

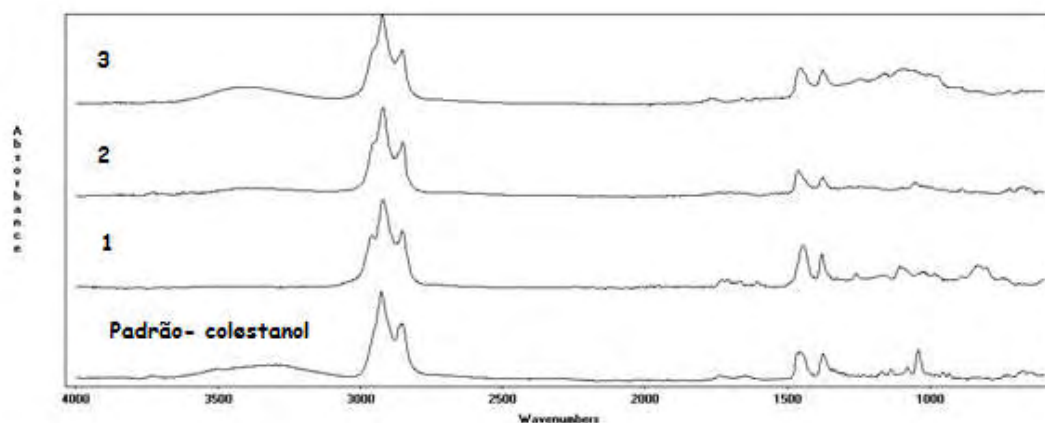


Figura 26 – Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 2; coluna de SPE de sílica; amostra A1) com o padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

É visível que a 3ª fracção eluída em comparação com o padrão, apresenta muitas semelhanças, por isso, pode ser considerado um bom método de separação. Assim, a fracção que nos interessa e que poderá conter os esteróis é a número 3.

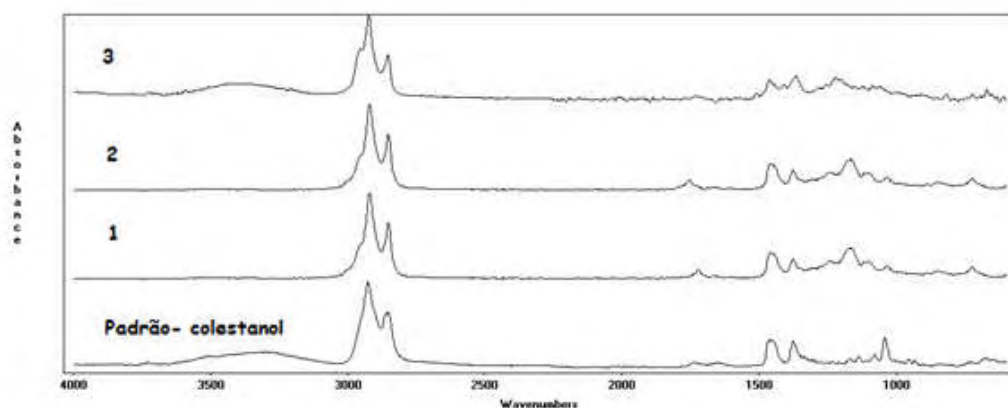


Figura 27 – Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 2; coluna de SPE de sílica; amostra A2) com o padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

A partir da observação do espectro acima, a fracção que deveria conter os esteróis (três) apresenta os mesmos picos característicos do padrão. Aqui, à semelhança do último espectro, a fracção que parece conter os esteróis é a número três.

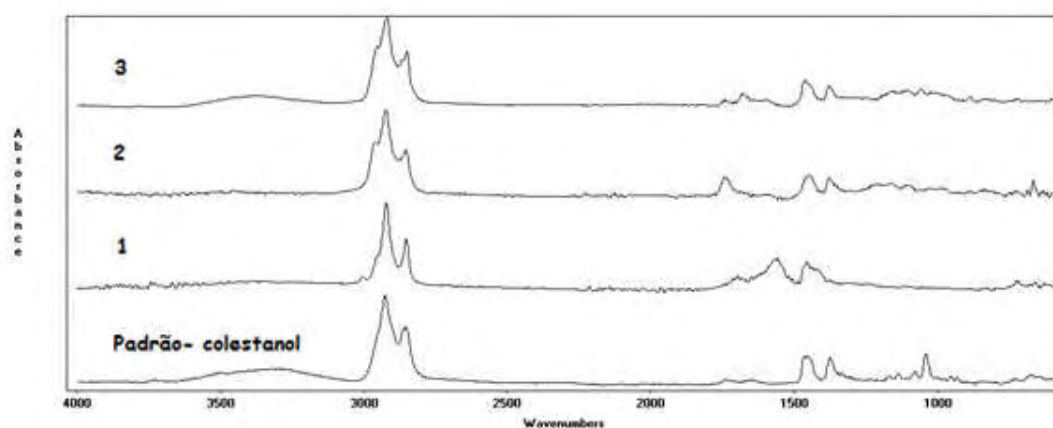


Figura 28 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 2; coluna de SPE de Florisil; amostra H1) com o padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

Em relação aos espectros anteriores pode-se dizer que está presente na fracção 3, uma elongação por volta dos 3500 cm^{-1} , dois picos próximos de 1500 cm^{-1} , ambos característicos do padrão e um pico muito pequeno incaracterístico junto a 1720 cm^{-1} que não deverá afectar os resultados. Também aqui a fracção número três parece ser a que contém os esteróis.

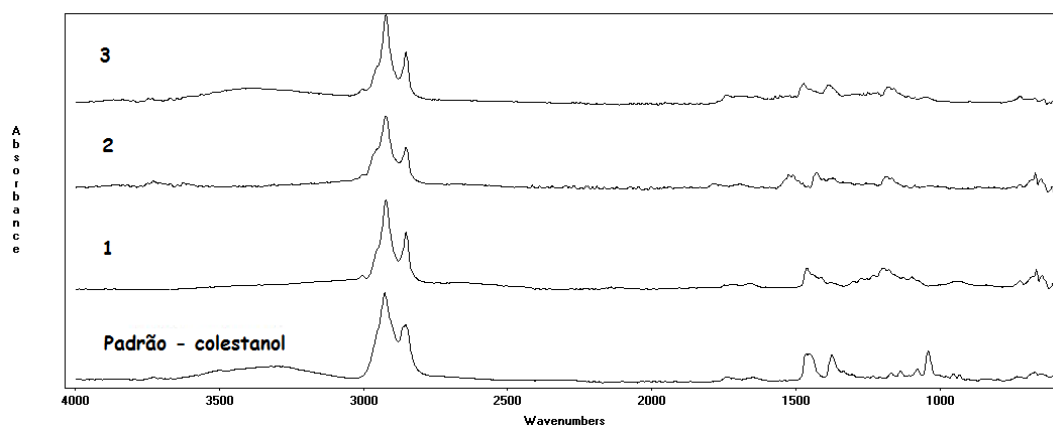


Figura 29 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 2; coluna de SPE de Florisil; amostra H2) com o padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

A partir da observação do espectro acima, a fracção parece conter os esteróis é a três, pois apresenta os mesmos picos característicos do padrão.

Método SPE 3 – (Sílica ou Florisil)

Os seguintes espectros são respeitantes às eluições do método SPE 3. A coluna de SPE utilizada foi a de sílica.

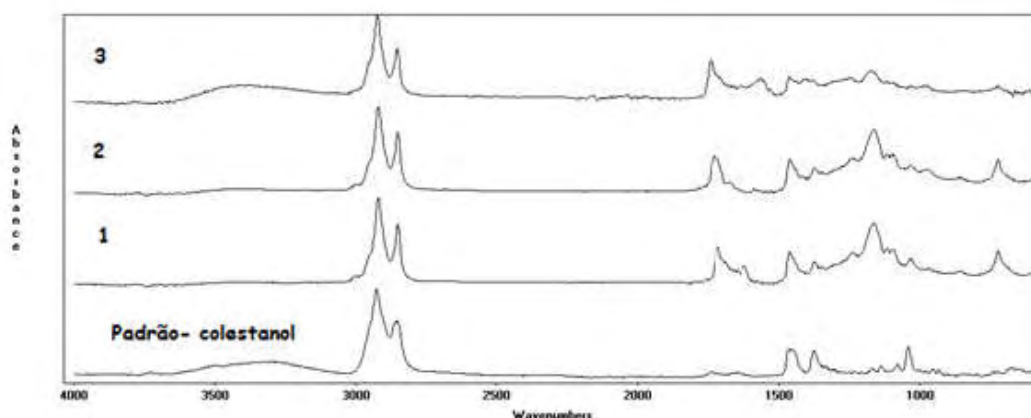


Figura 30 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 3; coluna de SPE de sílica; amostra B2) com o padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

Nestes espectros é possível ver em todas as fracções eluídas por este método picos a 1745 cm^{-1} característicos de grupos éster e 600 cm^{-1} característicos de cadeias hidrocarbonadas dos ácidos gordos dos ésteres correspondentes. Em comparação com o padrão podemos encontrar algumas só pequenas semelhanças na fracção que deveria conter os esteróis. Os espectros estariam mais de acordo com um espectro triglicérideos e de ceras o que não representa uma grande surpresa, visto tratar-se de um óleo de bagaço de azeitona, no qual a quantidade de ceras é elevada. Isto levanta a questão de eventualmente a saponificação não ter sido completa neste caso.

Os seguintes espectros são respeitantes às eluições do método SPE 3. A coluna de SPE utilizada foi a de sílica.

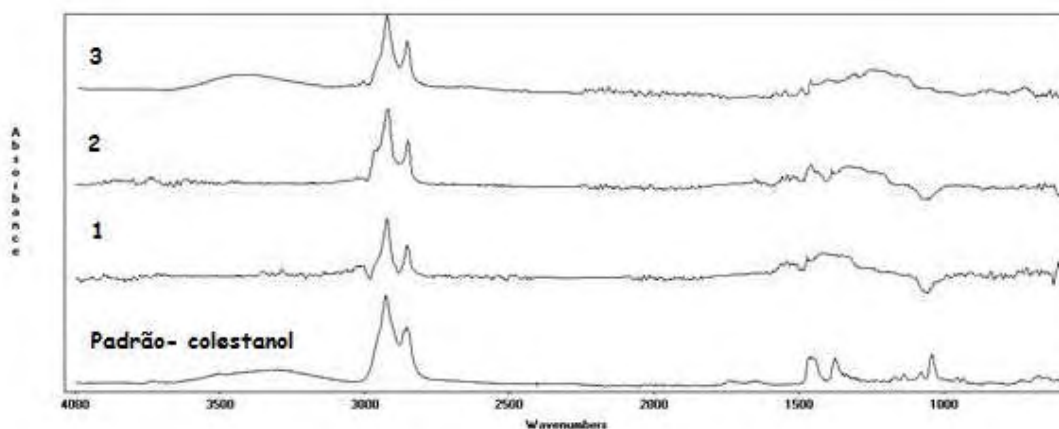


Figura 31 - Espectros de infravermelho onde estão representadas as comparações das fracções eluídas (método SPE 3; coluna de SPE de sílica; amostra B1) com o padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

Neste espectro da amostra B1, na terceira fracção existe uma banda correspondente a elongação O-H, que é característica do padrão, contudo o resto de espectro não apresenta bandas definidas. Não é de descartar um problema com o espectrómetro de IV porque há bandas que descem por abaixo da linha de base.

Para o cartucho/coluna de florisil os resultados obtidos para este método não mostraram bandas características do padrão.

Método SPE 4 – (Fase reversa C18)

Os seguintes espectros são respeitantes às eluições do método SPE 4. A coluna de SPE utilizada foi a de fase reversa C18.

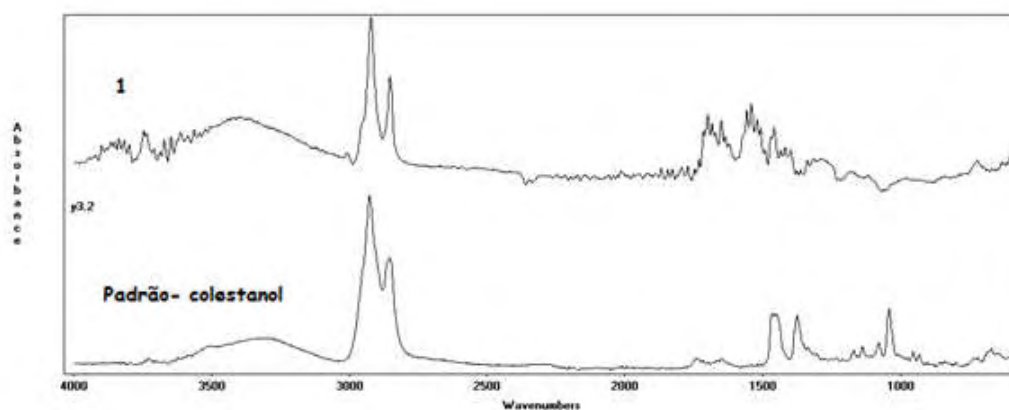


Figura 32 - Espectros de infravermelho onde está representado a comparação das fracção eluída (método SPE 4; coluna de SPE de fase reversa C18; amostra F1) com o padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

Os seguintes espectros são respeitantes às eluições do método SPE 4. A coluna de SPE utilizada foi a de fase reversa C18.

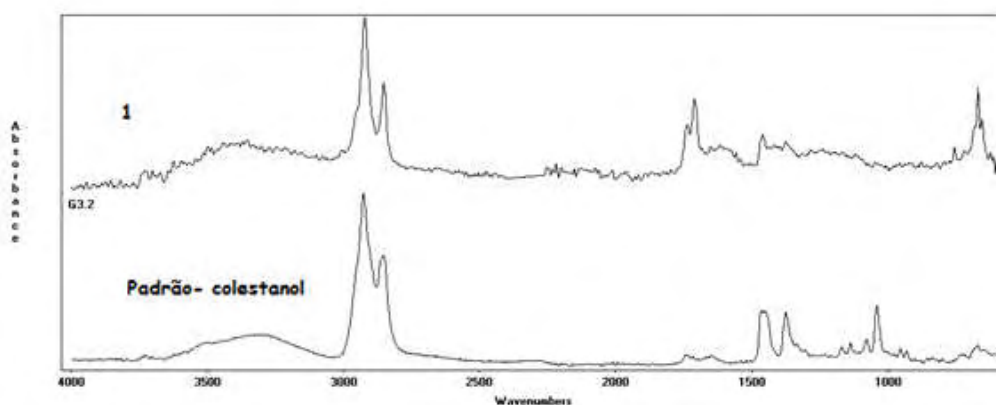


Figura 33 - Espectros de infravermelho onde está representado a comparação das fracção eluída (método SPE 4; coluna de SPE de fase reversa C18; amostra F2) com o padrão, entre 550 cm^{-1} e 4000 cm^{-1}

Para este último método, vários picos incaracterísticos foram detectados (em todas as amostras), prevendo-se assim que este último método não seja o mais desejado para a separação. Parece existir uma acumulação de compostos com ligações éster, que podem ser resultantes de uma saponificação incompleta. Novamente trata-se aqui de uma amostra de óleo de bagaço que pode estar contaminada com ceras. De qualquer forma para utilizar estes cartuchos será preciso realizar um estudo mais detalhado.

Em relação aos diferentes métodos para as diferentes colunas de SPE, dos apresentados, o que reúne melhores resultados é o método SPE 2, não só pelos espectros (mais semelhantes com o padrão), mas também por uma relação gasto de solventes, tempo gasto no procedimento e por ser aplicável a uma grande quantidade de amostras. Mas só depois de uma análise quantitativa se pode confirmar este resultado. Neste trabalho o principal papel da espectroscopia IV foi não só de facilitar a verificação das amostras no procedimento de saponificação e separação, como também de prevenir erros. Ajudou também a monitorizar a fracção onde estavam maioritariamente os esteróis, podendo-se assim verificar se estavam a eluir na fracção desejada.

2 Análise em GC

Depois da análise de IV às amostras saponificadas e fracções eluídas, foi efectuada a análise GC. De modo a conhecer melhor a coluna de cromatografia gasosa e os tempos de retenção de alguns dos compostos com que estávamos a trabalhar foi injectado o padrão e soluções de concentração conhecida, como demonstra o cromatograma seguinte.

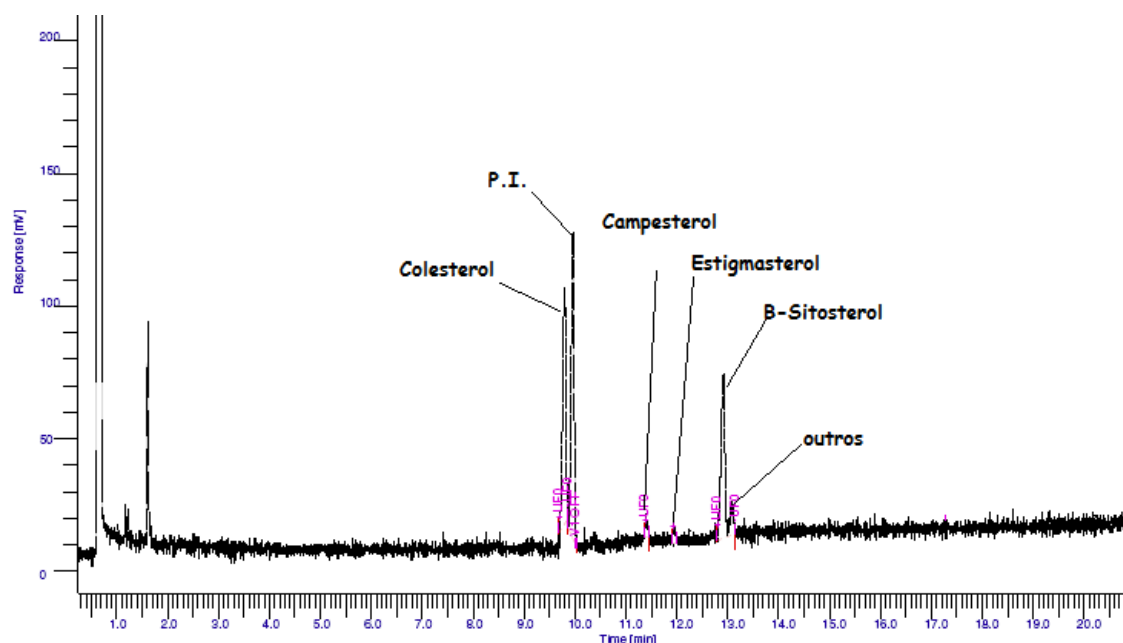


Figura 34 - Cromatograma representativo do tempo de retenção do colestanol (Padrão interno, 5 α -Cholestan-3 β -ol) e de outros principais esteróis presentes no azeite

Resultados e Discussão

Com o cromatograma obteve-se os tempos de retenção do colestanol e colesterol, com 9,90 e 9,96 minutos, respectivamente. Para o beta-sitosterol o cromatograma obtido apresenta informação adicional, porque vários outros picos são visíveis, isto devido ao facto de ser só de 60% de pureza e de conter também o campesterol e estigmasterol, obtendo-se os tempos (min.) de retenção, que são 11,41 para o campesterol, 12,00 para o estigmasterol e 12,93 para o beta-sitosterol (tabela 7).

Tabela 7 – Comparação do tempo de retenção entre o padrão interno (PI) e os fitosteróis

Esterol	Tempo (min.)	Tempo de retenção relativo ao PI (min.)
PI	9,96	-
Campesterol	11,41	1,41
Estigmasterol	12,00	2,04
B-Sitosterol	12,93	2,97

Depois de derivatizadas as amostras, estas foram directamente injectadas no GC, tendo-se obtido um cromatograma para cada amostra. Após o tratamento dos cromatogramas foi necessário uma verificação e identificação dos compostos desejados, isto é, precisava-se de saber se estavam a sair no tempo de retenção certo, ou pelo menos com o mesmo tempo em relação ao padrão interno (tabela 8). Está apresentado de seguida o tratamento para as amostras A1 e A2, mas foi igualmente feito para as restantes amostras, estando os resultados apresentados nas tabelas 10, 11, 12 e 13.

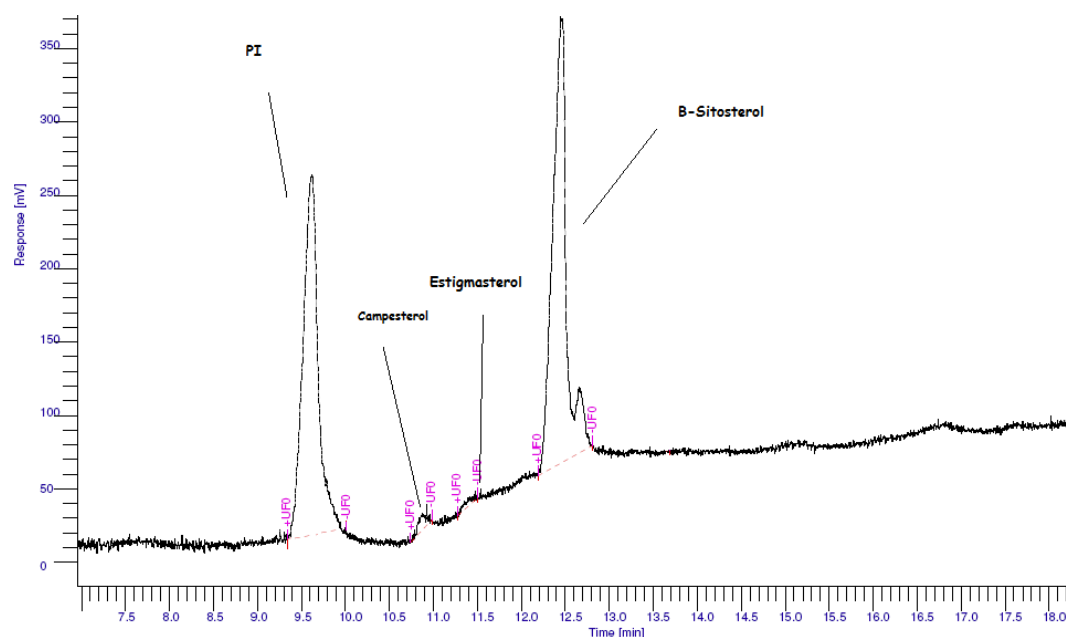


Figura 35 - Cromatograma representativo da fracção injectada (amostra A1 depois de ser derivatizada)

Conforme demonstra a figura 35 os picos a quantificar estão todos presentes, assim, depois da aplicação das fórmulas da secção 1.5.4 e 1.5.5 deste trabalho, obteve-se os resultados expressos na tabela seguinte.

Tabela 8 – Representação das percentagens de fitosteróis presentes na Amostra A1, tanto como a seu tempo de retenção, área de pico, tempo de retenção relativo ao PI e quantidade de esteróis individuais e totais

Esterol	Tempo (min.)	Área (%)	Tempo de retenção relativo ao PI (min.)	mg/kg	%
PI	9,37	40,6	-	-	-
Campesterol	10,93	1,5	1,56	34,7	2,5
Estigmasterol	11,35	0,6	1,98	13,6	1,0
B-Sitosterol	12,45	57,3	3,08	1409,9	96,5
Esteróis totais (mg/kg)			1458,3		

Como se sabia a diferença dos tempos de retenção em relação ao padrão (tabela 7), para campesterol, estigmasterol e beta-sitosterol, foi possível a partir daí verificar nos restantes cromatogramas essa diferença e identificar os picos pretendidos.

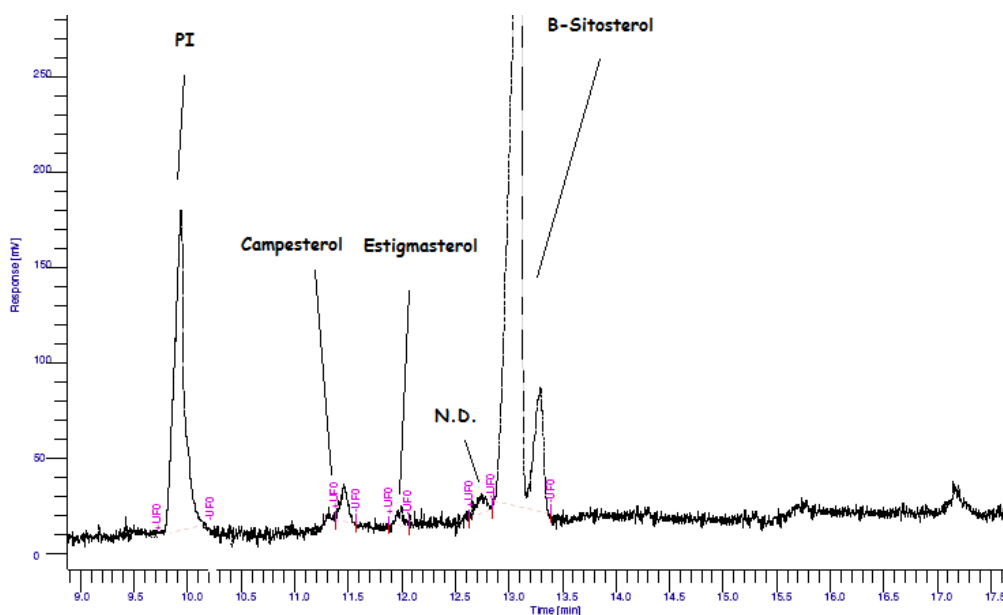


Figura 36 - Cromatograma representativo da fracção injectada (amostra A2 depois de ser derivatizada)

Tabela 9 - Representação da percentagem de fitosteróis presentes na Amostra A2, tanto como a seu tempo de retenção, área de pico, tempo de retenção relativo ao Padrão Interno (PI) e quantidade de esteróis individuais e totais

Esterol	Tempo de retenção (min.)	Área (%)	Tempo de retenção relativo ao PI (min.)	mg/kg	%
PI	9,99	23,6	-	-	-
Campesterol	11,46	2,0	1,47	83,8	2,6
Estigmasterol	12,00	1,1	2,01	45,7	1,4
B-Sitosterol	12,74	73,3	2,75	3100,7	96,0
Esteróis totais (mg/kg)			3230,1		

O procedimento de cálculo do teor de esteróis totais e individuais apresentados nas tabelas abaixo foi o mesmo que se usou no cálculo dos esteróis para as amostras A1 e A2.

Tabela 10 – Valores dos esteróis totais respeitantes as amostras de azeite para o respectivo método de extracção, saponificação e tipo de coluna.

Azeite				
Esteróis totais		Método de saponificação	Método de extracção	Tipo de coluna
Amostras	mg/Kg (± 0,1)	3		
A1	1458,3		SPE 2	Sílica
H1	1361,7		SPE 2	Florisil
C1	- ⁽¹⁾		SPE 1	Sílica
D1	- ⁽¹⁾		SPE 1	Florisil
E1	- ⁽¹⁾		SPE 4	C18
F1	- ⁽¹⁾		SPE 4	C18
G1	- ⁽¹⁾		SPE 3	Florisil
B1	1118,3		SPE 3	Sílica
(1)Por análise IV conclui-se que a fracção da amostra que continha esteróis estava contaminadas e por isso não foram injectadas				

Tabela 11 - Valores dos esteróis totais respeitantes as amostras de óleo de bagaço de azeitona para o respectivo método de extracção, saponificação e tipo de coluna.

Óleo de bagaço de azeitona				
Esteróis totais		Método de saponificação	Método de extracção	Tipo de coluna
Amostras	mg/Kg (± 0,1)	3		
A2	3230,1		SPE 2	Sílica
H2	3016,6		SPE 2	Florisil
C2	- ⁽¹⁾		SPE 1	Sílica
D2	- ⁽¹⁾		SPE 1	Florisil
E2	- ⁽¹⁾		SPE 4	C18
F2	- ⁽¹⁾		SPE 4	C18
G2	- ⁽¹⁾		SPE 3	Florisil
B2	2842,9		SPE 3	Sílica
(1)Por análise IV conclui-se que a fracção da amostra que continha esteróis estava contaminadas e por isso não foram injectadas				

Conforme indica a norma (tabela 4), o teor de esteróis totais para um azeite deve ser ≥ 1000 mg/Kg, para um óleo de bagaço de azeitona ≥ 1600 mg/Kg e para o óleo de bagaço de azeitona bruto ≥ 2500 mg/Kg. Assim pode-se dizer que para as amostras testadas com azeite os resultados mostram que está dentro do limite estabelecido pela norma, não ultrapassando os 1600 mg/Kg e não sendo menor que 1000 mg/Kg. No caso do óleo de bagaço de azeitona verificou-se que estava dentro dos limites esperados pela da norma, tratando-se de um óleo de bagaço de azeitona bruto, apresentando para os esteróis totais um valor superior a 2500 mg/Kg.

Tabela 12 – Percentagem de fitosteróis para cada amostra (azeite)

Azeite			
Amostras	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	Beta-sitosterol (%)*
A1	2,5	1,0	96,5
B1	2,0	0,9	97,1
C1	-	-	-
D1	-	-	-
E1	-	-	-
F1	-	-	-
G1	-	-	-
H1	2,2	1,5	96,3

*Soma de delta-5,23-estigmastadieno + clerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

Tabela 13 - Percentagem de fitosteróis para cada amostra (óleo de bagaço de azeitona)

Óleo de bagaço de azeitona			
Amostras	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	Beta-sitosterol (%)*
A2	2,6	1,4	96,0
B2	1,4	0,7	97,9
C2	-	-	-
D2	-	-	-
E2	-	-	-
F2	-	-	-
G2	-	-	-
H2	2,0	1,1	96,9

*Soma de delta-5,23-estigmastadieno + cleroesterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

No que diz respeito a percentagens de teor de esteróis individuais, os resultados demonstram que todas as amostras estão dentro do limite designado pela norma, apresentando valores para o beta-sitosterol de ≥ 93 %, para o Campesterol $\leq 4\%$ e para o Estigmasterol inferior ao de Campesterol.

Concluída a análise e comparação do teor de esteróis com os limites da norma, é necessária uma análise a todo o procedimento, desde do tipo de coluna utilizado, à extracção, incluindo no meio o processo de saponificação. Começando então pelo tipo de cartucho utilizado, é visível que a que apresenta mais viabilidade para o processo de separação é o de sílica. Veja-se que, das três amostras de azeite em que se obteve resultados, duas colunas/cartuchos eram de sílica e uma de florissil. O mesmo aconteceu no caso das amostras de óleo de bagaço de azeitona. Aquando o uso das colunas de fase reversa C18 e sabendo que a nossa amostra devia estar privada ao máximo de água (humidade) antes de ser derivatizada para análise por GC, deparou-se com o problema de esta ser activada com água e metanol, podendo incluir passos adicionais de secagem para não afectar os resultados. Assim das três colunas utilizadas a que demonstrou melhores resultados foi a de sílica, apesar do uso da de florissil não seja descartada.

Quanto aos métodos de saponificação utilizados, obteve-se melhores resultados para o método 3, tendo este utilizado menos quantidade de amostra (vantagem), uso de menos solventes e foi através do qual se obteve mais e melhores resultados. Excluindo-se assim o método 1 e 2 porque não foram obtidos resultados satisfatórios.

Para a extracção destaca-se o SPE 2 (com coluna de sílica) devido ao facto de com este método se ter obtido melhores resultados. O método SPE 3 (com coluna de sílica) revelou em relação ao SPE 2 (com coluna de sílica) uma percentagem de recuperação média de menos 18 %. No que diz respeito à relação do SPE 2 (com coluna de sílica) e o SPE 2 (com coluna de florissil), este último

revelou uma percentagem de recuperação média 7 % menor. Desta parte, o método SPE 1 e SPE 4, devido aos maus resultados que ofereceram, consideram-se os mais desapropriados para o efeito nas condições testadas (supondo uma taxa de recuperação de 100%).

É de realçar que houve necessidade de analisar em IV todas as diferentes fracções eluídas dos cartuchos, sendo que alguns problemas foram encontrados, apresentada como contaminação por sinais do grupo éster. Assim e depois de verificar que a amostra injectada com a contaminação baixava significativamente a capacidade de detecção dos picos, isto é a injeção de várias amostras deste tipo fizeram com que a coluna ficasse contaminada e as próximas análises ficassem afectadas negativamente. Os triglicérideos e ou as ceras não só não volatilizam nas condições de temperatura do injectador, como também vão a solubilizar os esteróis impedindo-os de se volatilizar. Assim, a injeção de uma amostra contaminada com triglicérideos e ceras num instrumento de GC, vai fazer com que o liner do injectador seja contaminado muito rapidamente assim como o início da coluna também. Depois de verificar a existência deste problema foi efectuada a mudança do liner e só foram injectadas amostras que não apresentavam bandas de éster a 1745 cm^{-1} nos espectros de infravermelho o que levou à obtenção de bons resultados.

Parte IV - Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho de investigação de metodologias alternativas para a determinação do teor de esteróis em azeite em relação ao método oficial, demonstram que o objectivo foi atingido.

Assim há que sublinhar a importância que a análise de IV pode vir a ter, não só para ver quais as fracções contêm os esteróis, mas também para verificar se amostra se encontra contaminada, evitando trabalho desnecessário e prevenindo o erro.

Comprovou-se também que o azeite comercial utilizado neste trabalho se encontrava dentro dos limites da norma, apresentando o melhor método uma quantidade de esteróis totais de $1458,3 \pm 0,1$ mg/kg. No caso do óleo de bagaço de azeitona verificou-se que estava dentro dos limites esperados pela da norma, tratando-se de um óleo de bagaço de azeitona bruto com uma quantidade de esteróis totais de $3230,1 \pm 0,1$ mg/kg. No que diz respeito às percentagens de esteróis individuais, os resultados demonstram que todas as amostras estão dentro do limite designado pela norma, apresentando valores para o beta-sitosterol de $\geq 93\%$, para o campesterol $\leq 4\%$ e para o estigmasterol inferior ao de campesterol.

Das soluções testadas, pode-se destacar como mais adequado o método 3 na parte da saponificação e o método SPE 2 na parte da separação esterólica, ambos por apresentarem os melhores resultados pelos métodos instrumentais, ser reduzido a quantidade de solventes, o tempo gasto ser reduzido, ser aplicável a várias amostras, ser de fácil aplicação/operação e apresentar valores para esteróis totais e individuais de acordo com os que a norma estipula. Em relação à metodologia utilizada, esta parece ser promissora, apesar de não se ter comparado os resultados obtidos com os realizados pelo método oficial. Assim, por se tratar de um produto caro, muito consumido em toda a Europa, bastante apreciado pelos portugueses e por existir até ao momento uma norma europeia desactualizada (1991) e não adaptada à tecnologia e tempos modernos, esta metodologia deve ser aplicada na avaliação de pureza e qualidade do azeite, porque hoje em dia, devido a crise económica vivida, torna-se comum a adulteração deste produto com outros óleos vegetais ou com azeite de qualidade inferior. Para estudos futuros, a introdução de análise multivariada em combinação com o IV sem recorrer à cromatografia gasosa, seria uma boa opção de estudo, visto que a sua utilização tem vindo a crescer os últimos anos e simplificaria ainda mais a metodologia que é hoje utilizada.

Referências Bibliográficas

1. Saldanha, M. H., Benefícios do azeite na saúde humana, by Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas; Lisboa, 1999.
2. Boskou, D., Olive Oil : Minor Constituents and Health. CRC Press-Taylor & Francis Group: London, 2009.
3. Aparício, R. H., J., Handbook of olive oil: analysis and properties. Aspen; Publishers, I., Gaithersburg, Maryland, 2000.
4. Codex standard for olive oil and olive pomace oil, In CODEX Standards 33-1981, FAO/WHO, Ed. Rev.2-2003.
5. Determinação da composição e do teor de esteróis por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar. In Jornal Oficial da União Europeia CE, Ed. 2007; Vol. Regulamento (CE) N.º 702/2007, 22-26.
6. Ribeiro, L. H. Caracterização química do aroma de azeites virgens com atributos positivos e negativos. Lisboa, 2005.
7. Ramon Aparício , J. H., Manual del aceite de oliva. Mundi-prensa, 2003.
8. Belitz H. D., Grosch W. ; Schieberle P., Edible Fats and Oils, in Food Chemistry. Springer Berlin Heidelberg, 643-671, 2004.
9. Baccouri, O.; Guerfel, M.; Baccouri, B.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Lercker, G.; Zarrouk, M.; Daoud Ben Miled, D., *Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening*. Food Chemistry 2008, 109, (4), 743-754.
10. Frank D. Gunstone, J. L. H., Albert J. Dijkstra, Lipid Metabolism. In *The Lipid Handbook*, 3 ed.; Group, T. F., Ed. CCR Press: London, 2007.
11. Pérez-Camino, M. C.; Moreda, W.; Mateos, R.; Cert, A., *Simultaneous determination of long-chain aliphatic aldehydes and waxes in olive oils*. Journal of Chromatography A, 2003, 983, (1-2), 283-288.
12. Casimir C. Akoh , D. B. M., Chemistry of Waxes and Sterols. In *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 3 ed.; Press, C., Ed. Taylor & Francis Group: London, 2008.
13. Denise Fabiana Silvestre, B. L., Aparecida Guaraldo, Gonçalves ; Renato, Grimaldi ; Gabriela Bonfante, Fernandes, *Phytosterol quantification in imported olive oils available on the Campinas market, using Gas Chromatography*. Braz. J. Food Technology 2005, 8, 190-199.

14. Azadmard-Damirchi, S. *Olive Oil : Phytosterols, Tracing of Adulteration with Hazelnut Oil and Chemical Interesterification*. Swedish University, Uppsala 2007.
15. Azadmard-Damirchi, S.; Dutta, P. C., *Novel solid-phase extraction method to separate 4-desmethyl-, 4-monomethyl-, and 4,4'-dimethylsterols in vegetable oils*. Journal of Chromatography A 2006, 1108, (2), 183-187.
16. Paul, M. D., *The Mevalonate and Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids*. In Medicinal Natural Products (2nd Ed), 2001; pp 167-289.
17. Ozen, B. F.; Mauer, L. J., *Detection of Hazelnut Oil Adulteration Using FT-IR Spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50, (14), 3898-3901.
18. Supelco, Guide to Solid Phase Extraction. *Sigma-Aldrich Co.* 1998.
19. Magalhães, P. J. C. R. d. *Desenvolvimento de uma Metodologia Analítica para a Determinação de Xanto-Humol e Isoxanto-Humol no Lúpulo e na Cerveja*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2006.
20. Discoverysciences, General Chromatography. In *SPE Introduction*, Grace Davison, 1999.
21. Fernando M. Lanças. Em "Extração em Fase Sólida (SPE)". Ed. RiMa, S., 96-99, 2004.
22. Sinelli, N.; Cosio, M. S.; Gigliotti, C.; Casiraghi, E., *Preliminary Study on Application of Mid Infrared Spectroscopy for the Evaluation of the Virgin Olive Oil "Freshness"*. Analytica Chimica Acta 2007, 598, (1), 128-134.
23. Instrumentation for Step-scan FT-IR Modulation Spectrometry, C. J. M., Handbook of Vibrational Spectroscopy, Volume 1 (J. C. Chalmers and P. R. Griffiths, eds.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2002, 283-297.
24. Lai, Y. W.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H., *Quantitative Analysis of Potential Adulterants of Extra Virgin Olive Oil Using Infrared Spectroscopy*. Food Chemistry 1995, 53, (1), 95-98.
25. Galtier, O.; Dupuy, N.; Le Dréau, Y.; Ollivier, D.; Pinatel, C.; Kister, J.; Artaud, J., *Geographic Origins and Compositions of Virgin Olive Oils Determinated by Chemometric Analysis of NIR Spectra*. Analytica Chimica Acta, 2007, 595, (1-2), 136-144.
26. Gary, D., *Spectroscopy and Spectrometry of Lipids - Part 1*. European Journal of Lipid Science and Technology 2001, 103, (12), 815.
27. Erkki Mäeorga, P. L., Juhan Jõudua, and Uno Mäeorgb, *Some Important Aspects of Sterol Analysis of Vegetable Oils*. Estonian Academy of Sciences 2007.

28. Lerma-García, M. J.; Ramis-Ramos, G.; Herrero-Martínez, J. M.; Simó-Alfonso, E. F., *Authentication of Extra Virgin Olive Oils by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*. *Food Chemistry* 118, 2009, 78-83.
29. Bryan Ham, B. B., Paul Thionvill, *Evaluating the Isolation and Quantification of Sterols in Seed Oils by Solid-Phase Extraction and Capillary Gas-Liquid Chromatography*. *Chromatographyonline*, 2000, 18.
30. Características dos Azeites e dos Óleos de Bagaço de Azeitona, in *Jornal Oficial da União Europeia*, 11 de Julho de 1991; Vol. Regulamento (CEE) n.º 2568/91.
31. Azadmard-Damirchi, S.; Dutta, P. C., *A single step solid-phase extraction method for complete separation of sterol oxidation products in food lipids*. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216, (1), 36-42.
32. Cunha, S. S.; Fernandes, J. O.; Oliveira, M. B. P. P., *Quantification of Free and Esterified Sterols in Portuguese Olive Oils by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1128, (1-2), 220-227.

Anexos

A seguinte tabela serviu para identificação dos picos na espectroscopia de IV, ajudando na análise dos espectros.

Tabela 15 – Correspondência entre grupos representativos e número de onda para o IV (26)

Gama de frequência (cm ⁻¹)	Correspondência	
3400	H-OH (fenóis, álcoois e grupos carboxílicos) N-H (amidas e aminas)	
2925	Elongação CH nas estruturas alifáticas (ácidos gordos, ceras e outras estruturas de cadeia longa)	
2840	Elongamento simétrico do CH no -CH ₂	
1710	Elongação nos ácidos	Carbonil (C=O)
1730	Elongação nos aldeídos e cetonas	
1740	Elongação nos ésteres	
1620-1660	Elongação C=O nas amidas primárias	
1525	Elongação C=C nos compostos aromáticos	
1450-1460	Elongação CH nas estruturas alifáticas	
900-1300	Elongação CH e deformação dos OH nos carboxilos, C-O de éteres nos anéis aromáticos e NH das amidas secundárias	
<1000	Elongação nos éteres aromáticos, polissacarídeos (vibração C-H)	

Os seguintes cromatogramas foram utilizados para calcular as quantidades de esteróis em algumas amostras.

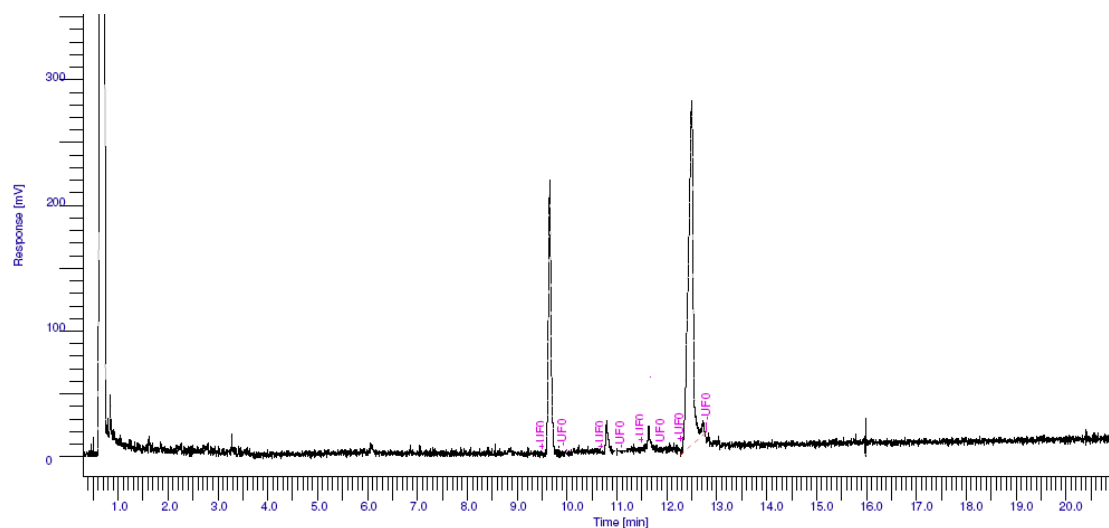


Figura 37 - Cromatograma representativo amostra B1 depois de ser derivatizada

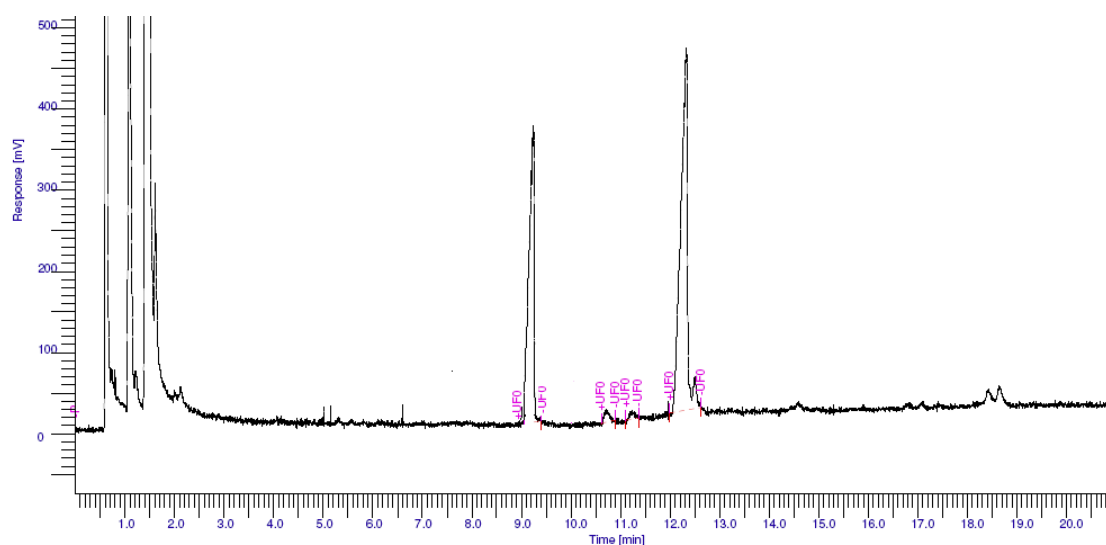


Figura 38 - Cromatograma representativo amostra H1 depois de ser derivatizada

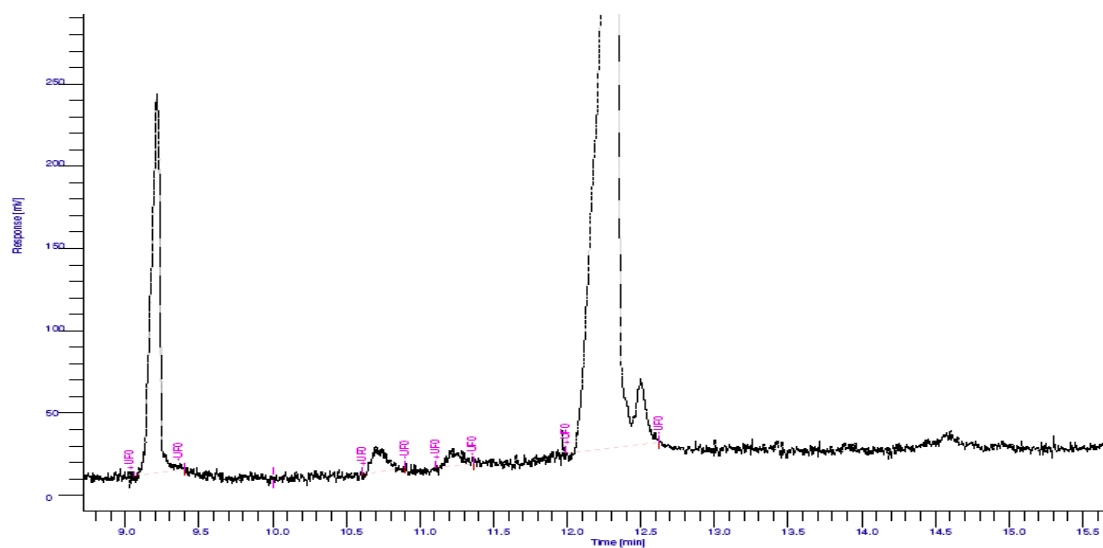


Figura 39 - Cromatograma representativo amostra H2 depois de ser derivatizada

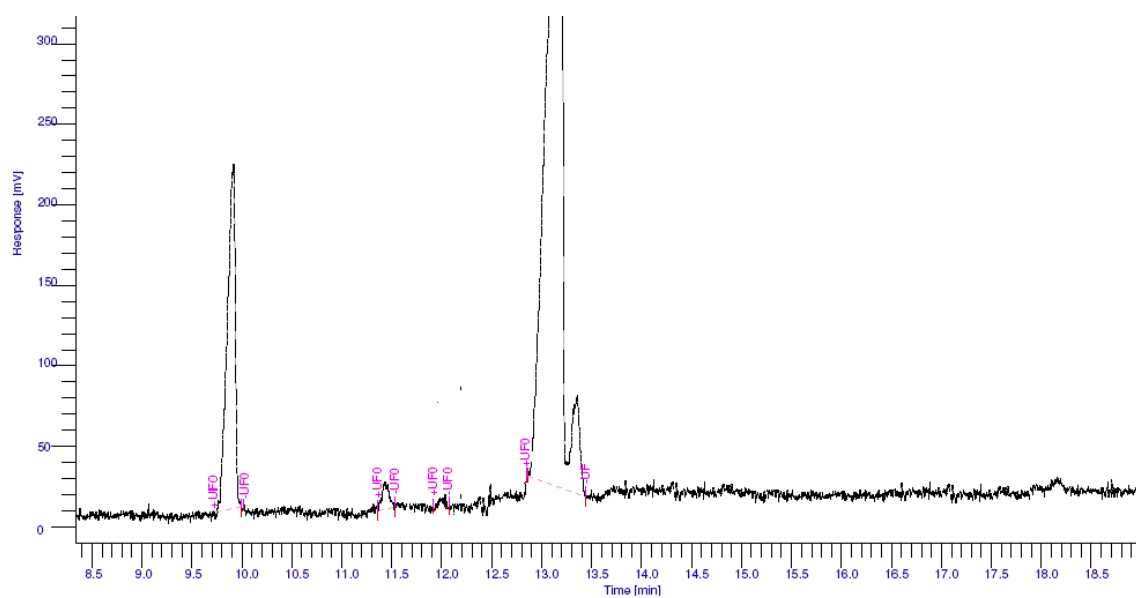


Figura 40 - Cromatograma representativo amostra B2 depois de ser derivatizada